

Europäisches
Patentamt

European Patent
Office

Office européen
des brevets

PCT/EP04/08624



Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten internationalen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the international patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet international spécifiée à la page suivante.

Den Haag, den
The Hague,
La Haye, le

23 SEP 2004

Der Präsident des Europäischen Patentamts
Im Auftrag
For the President of the European Patent Office
Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

R. Gattinot

Patentanmeldung Nr.
Patent application no.
Demande de brevet n°

PCT/EP 03/09101

BEST AVAILABLE COPY

Blatt 2 der Bescheinigung
Sheet 2 of the certificate
Page 2 de l'attestation

Anmeldung Nr.:
Application no.:
Demande n°:

PCT/EP 03/09101

Anmelder:
Applicant(s):
Demandeur(s):

1. SUNGENE GMBH & CO. KGAA - Gatersleben, Deutschland
2. KLEBSATTEL, Martin - Quedlinburg, Deutschland (nur US)
3. SAUER, Matt - Quedlinburg, Deutschland (nur US)

Bezeichnung der Erfindung:

Title of the invention:

Titre de l'invention:

Verfahren zur Herstellung von beta-carotinoiden

Anmeldetag:

Date of filing:

Date de dépôt:

18. August 2003 (18.08.2003)

In Anspruch genommene Priorität(en)

Priority(ies) claimed

Priorité(s) revendiquée(s)

Staat:

Deutschland

State:

Pays:

Tag:

Date: 16. Dezember 2002

Date: (16.12.2002)

Aktenzeichen

File no.

Numéro de dépôt:

10258971.2

Benennung von Vertragsstaaten : Siehe Formblatt PCT/RO/101 (beigefügt)

Designation of contracting states : See Form PCT/RO/101 (enclosed)

Désignation d'états contractants : Voir Formulaire PCT/RO/101 (ci-joint)

Bemerkungen:

Remarks:

Remarques:

Weitere Anmelder:

4. FLACHMAN, Ralf - Quedlinburg, Deutschland (nur US)
5. SCHOPFER, Christel Renate - Quedlinburg, Deutschland (nur US)

Weitere Prioritätsansprüche:

Deutschland

20. August 2002
(20.08.2002)

10238980.2

Deutschland

20. August 2002
(20.08.2002)

10238979.9

PCT-ANTRAG

0000054755

Original (für EINREICHUNG) - gedruckt am 06.08.2003 10:00:13 AM

V	Bestimmung von Staaten	
V-1	Regionales Patent (andere Schutzrechtsarten oder Verfahren sind ggf. in Klammern nach der (den) betreffenden Bestimmung(en) angegeben)	<p>AP: GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZM ZW und jeder weitere Staat, der Mitgliedstaat des Harare-Protokolls und Vertragsstaat des PCT ist</p> <p>EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM und jeder weitere Staat, der Mitgliedsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und Vertragsstaat des PCT ist</p> <p>EP: AT BE BG CH&LI CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL PT RO SE SI SK TR und jeder weitere Staat, der Mitgliedsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und Vertragsstaat des PCT ist</p> <p>OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG und jeder weitere Staat, der Mitgliedstaat der OAPI und Vertragsstaat des PCT ist</p>
V-2	Nationales Patent (andere Schutzrechtsarten oder Verfahren sind ggf. in Klammern nach der (den) betreffenden Bestimmung(en) angegeben)	<p>AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&LI CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NI NO NZ OM PG PH PL PT RO RU SC SD SE SG SK SL SY TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VC VN YU ZA ZM ZW</p>
V-5	Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen Zusätzlich zu den unter Punkten V-1, V-2 and V-3 vorgenommenen Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der nachstehend unter Punkt V-6 angegebenen Staaten. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt.	
V-6	Staaten, die von der Erklärung über vorsorgliche Bestimmungen ausgenommen werden	KEINE
VI-1	Priorität einer früheren nationalen Anmeldung beansprucht	
VI-1-1	Anmeldedatum	16 Dezember 2002 (16.12.2002)
VI-1-2	Nummer	10258971.2
VI-1-3	Staat	DE

Verfahren zur Herstellung von β -Carotinoiden

Beschreibung

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von β -Carotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Pflanzen, die genetisch veränderten Pflanzen, sowie deren Verwendung als Nahrungs- und Futtermittel und zur Herstellung von β -Carotinoidextrakten.
- 10 Carotinoide werden de novo in Bakterien, Algen, Pilzen und Pflanzen synthetisiert. β -Carotinoide, also Carotinoide des β -Carotin-Weges, wie beispielsweise β -Carotin, β -Cryptoxanthin, Zeaxanthin, Antheraxanthin, Violaxanthin und Neoxanthin sind natürliche Antioxidantien und Pigmente, die von Mikroorganismen, Algen, Pilzen und Pflanzen als Sekundärmetabolite produziert werden.
- 15 β -Carotin ist eine Vitamin A Vorstufe und damit wichtiger Bestandteil in Food-, Feed- und Kosmetik-Anwendungen. Ferner dient es als Pigmentierstoff in vielen Bereichen, wie beispielsweise in der Getränkemittelindustrie.
- 20 Zeaxanthin ist eines der Hauptpigmente in der Macula des menschlichen Auges und schützt durch sein spezielles Lichtabsorptionsspektrum die empfindlichen Sehzellen. Durch die Lichteinstrahlung wird Zeaxanthin degradiert und muss mit der Nahrung wieder zugeführt werden um einen effizienten Schutz der Macula zu erhalten und Langzeitschäden, wie die altersbedingte Maculadegeneration (ADM), zu vermeiden.
- 25 Ferner dient Zeaxanthin als Pigmentierstoff von Tierprodukten, insbesondere zur Pigmentierung von Eidotter, Haut und Fleisch von Hühnervögeln durch orale Verabreichung.
- Viele β -Carotinoide sind zudem von hohem wirtschaftlichen Interesse, da sie in ihrer
- 30 Eigenschaft als Farbpigmente und Antioxidantien als Nahrungsmittelzusätze, Farbstoffe, Konservierungsstoffe, Futtermittel und Nahrungsergänzungsmittel genutzt werden.
- Die Herstellung von β -Carotinoiden, wie beispielsweise β -Carotin und Zeaxanthin
- 35 erfolgt heutzutage größtenteils durch chemische Syntheseverfahren.
- Natürliche β -Carotinoide, wie beispielsweise natürliches β -Carotin, werden in biotechnologischen Verfahren in kleinen Mengen durch Kultivierung von Mikroorganismen, Algen oder Pilzen oder durch Fermentation von gentechnologisch optimierten Mikro-
- 40 organismen und anschließender Isolierung gewonnen.

Natürliches Zeaxanthin ist Bestandteil von sogenanntem Oleoresin, einem Extrakt aus getrockneten Petalen der Pflanze *Tagetes erecta*. Der Gehalt an Zeaxanthin in Oleoresin ist jedoch gering, da die Carotinoide in den Petalen von *Tagetes erecta* zur überwiegenden Mehrheit aus Carotinoiden des α -Carotin-Weges, wie beispielsweise Lutein, bestehen.

Die Erhöhung des β -Carotinoid Gehaltes in Pflanzen bzw. in den entsprechenden Pflanzengeweben ist daher ein wichtiges Ziel der biotechnologischen Optimierung von Pflanzen.

Carlo Rosati et al. beschreiben die Überexpression einer β -Cyclase aus *Arabidopsis thaliana* mit einem fruchtspezifischen Promoter in Tomate (Rosati C, Aquilani R, Dharmapuri S, Pallara P, Marusic C, Tavazza R, Bouvier F, Camara B, Giuliano G. Metabolic engineering of beta-carotene and lycopene content in tomato fruit. Plant J. 2000 Nov;24(3):413-9.). Hierdurch wird das in der Wildtypfrucht vorhandene Lycopin verstärkt in β Carotin überführt.

Sridhar Dharmapuri et al. beschreiben die Überexpression einer β Cyclase und die Kombination mit der Überexpression einer β Hydroxylase in der Frucht von Tomate (Dharmapuri S, Rosati C, Pallara P, Aquilani R, Bouvier F, Camara B, Giuliano G. Metabolic engineering of xanthophyll content in tomato fruits, FEBS Lett. 2002 May 22;519(1-3):30-4). Der Gehalt an α Carotinoiden, hier Lutein, ist beziffert. Die Lutein Mengen liegen in allen Fällen zwischen 1,0 und 2,0 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Frischgewicht (Wildtyp: 1,9 $\mu\text{g}/\text{mg}$) und der Anteil von Lutein an den Gesamtcarotinoiden beträgt in allen beschriebenen Fällen zwischen 1,4 und 2,9% (Wildtyp: 2,8%). In keiner Frucht dieser transgenen Pflanzen wird der Anteil an Lutein signifikant reduziert.

EP 393690 B1, WO91/13078 A1, EP 735137 A1, EP 747483 A1 und WO 97/36998 A1 beschreiben β -Cyclase-Gene.

EP 393690 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von Carotinoiden durch Nutzung mindestens eines der Gene codierend für Phytoen Synthase, Phytoen Dehydrogenase, β -Cyclase und β Hydroxylase erhalten aus *Erwinia uredovora*.

WO91/13078 A1 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von Carotinoiden durch Nutzung der Gene ausgewählt aus GGPP-Synthase, Phytoen Synthase, Phytoen Dehydrogenase, β -Cyclase und β Hydroxylase erhalten aus *Erwinia herbicola*.

WO 96/36717 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von Carotinoiden durch Nutzung von Genen, codierend für β -Cyclase, erhalten aus *Capsicum annum*.

EP 747 483 A1 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von Carotinoiden durch Nutzung der Gene codierend für GGPP-Synthase, Phytoen Synthase, Phytoen Dehydrogenase, β -Cyclase und β Hydroxylase erhalten aus Flavobakterium.

- 5 WO 96/28014 beschreibt und beansprucht DNA Sequenzen codierend für eine β Cyclase aus Synechococcus sp. PCC7942, Tabak und Tomate.

- 10 WO 00/08920 beschreibt ein neues β -Cyclase-Gen aus Tomate (Bgene), die Verwendung der Regulationssignale des Bgenes zur chromoplastenspezifischen Expression von Fremdgenen sowie die Verwendung der antisense DNA von Bgene zur Reduktion des β Carotinoid Gehaltes in Tomate. WO 00/08920 beschreibt ferner, dass das Bgene zur Herstellung von Carotinoiden in höheren Pflanzen überexprimiert werden kann.

- 15 WO 00/32788 beschreibt ein Verfahren zur Manipulation des Carotinoidgehaltes in Pflanzen mittels β -Cyclase-Genen aus Marigold. WO 00/32788 beschreibt ferner genetisch veränderte Marigold Pflanzen die eine β -Cyclase überexprimieren. WO 00/32788 beschreibt ferner genetisch veränderte Marigold Pflanzen mit einer reduzierten ϵ -Cyclase Aktivität.

- 20 Alle Verfahren des Standes der Technik liefern zwar teilweise einen höheren Gehalt an β -Carotinoiden am Gesamtcarotinoid-Gehalt, jedoch ohne die Menge an α -Carotinoiden signifikant abzusenken. Das gezielte Absenken des Gehalts an α -Carotinoiden nach den Verfahren des Standes der Technik, wie beispielsweise die Reduzierung der ϵ -Cyclase Aktivität, führt jedoch zu einer Abnahme des Gesamtcarotinoid-Gehalts.

- 25 Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, ein alternatives Verfahren zur Herstellung von β -Carotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Pflanzen zur Verfügung zu stellen, bzw. weitere transgene Pflanzen, die β -Carotinoide herstellen, zur Verfügung zu stellen, die die geschilderten Nachteile des Standes der Technik
30 nicht aufweisen und einen hohen Gehalt an β -Carotinoiden liefern, bei einer gleichzeitig niedrigeren Menge an α -Carotinoiden.

- 35 Demgemäß wurde ein Verfahren zur Herstellung von β -Carotinoiden gefunden, indem man genetisch veränderten Pflanzen kultiviert, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität in Pflanzengewebe, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, aufweisen und die erhöhte β -Cyclase-Aktivität durch eine β -Cyclase verursacht wird, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der

Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, mit der Maßgabe, dass Tomate als Pflanze ausgenommen ist.

Überraschenderweise wurde gefunden, dass die Erhöhung der β -Cyclase-Aktivität in Pflanzengewebe, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, verursacht durch eine β -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, in genetisch veränderten Pflanzen mit der Ausnahme von Tomate zu einer Erhöhung des Gehalts an β -Carotinoiden und zu einer Erniedrigung des Gehalts an α -Carotinoiden.

Unter β -Cyclase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer β -Cyclase verstanden.

Unter einer β -Cyclase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, einen endständigen, linearen Rest von Lycopin in einen β -Ionon-Ring zu überführen.

Insbesondere wird unter einer β -Cyclase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Lycopin in γ -Carotin, γ -Carotin in β -Carotin bzw. Lycopin in β -Carotin umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter β -Cyclase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein β -Cyclase umgesetzte Menge Lycopin oder γ -Carotin bzw. gebildete Menge γ -Carotin oder β -Carotin verstanden.

Bei einer erhöhten β -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein β -Cyclase die umgesetzte Menge Lycopin oder γ -Carotin bzw. gebildete Menge γ -Carotin oder β -Carotin erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der β -Cyclase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der β -Cyclase-Aktivität des Wildtyps.

Die Bestimmung der β -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

Die Aktivität der β -Cyclase wird nach Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15) *in vitro* bestimmt. Es werden zu einer bestimmten Menge an Pflanzenextrakt Kaliumphosphat als Puffer (pH 7.6), Lycopin als Substrat, Stroma-protein von Paprika, NADP⁺, NADPH und ATP zugegeben.

5

Der *in-vitro* Assay wird in einem Volumen von 250 μ l Volumen durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), unterschiedliche Mengen an Pflanzen-extrakt, 20 nM Lycopin, 250 μ g an chromoplastidärem Stromaprotein aus Paprika, 0.2 mM NADP⁺, 0.2 mM NADPH und 1 mM ATP. NADP/NADPH und ATP werden in 10 ml Ethanol mit 1 mg Tween 80 unmittelbar vor der Zugabe zum Inkubationsmedium gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 30°C wird die Reaktion durch Zugabe von Chloroform/Methanol (2:1) beendet. Die in Chloroform extrahierten Reaktionsprodukte werden mittels HPLC analysiert.

10

Ein alternativer Assay mit radioaktivem Substrat ist beschrieben in Fraser und Sand-mann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15).

20

Unter dem Begriff „photosynthetisch inaktive Plastide“ werden Plastide verstanden, in denen keine Photosynthese stattfindet, wie beispielsweise Chromoplasten, Leukoplas-ten oder Amyloplasten.

25

Dementsprechend werden unter dem Begriff „Pflanzengewebe, enthaltend photosyn-thetisch inaktive Plastide“ Pflanzengewebe oder Pflanzenteile verstanden, die Plastide enthalten, in denen keine Photosynthese stattfindet, also beispielsweise Pflanzen-gewebe oder Pflanzenteile, die Chromoplasten, Leukoplasten oder Amyloplasten enthalten, wie beispielsweise Blüten, Früchte oder Knollen.

30

In einer nachstehend ausführlich beschriebenen Ausführungsform sind die Pflanzen-gewebe, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, ausgewählt aus der Gruppe Blüte, Frucht und Knolle.

35

Je nach verwendeter Ausgangspflanze oder entsprechender genetisch veränderter Pflanze weist die Pflanze in dieser bevorzugten Ausführungsform eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität in Blüten, Früchten oder Knollen im Vergleich zum Wildtyp auf.

Dabei ist es vorteilhaft für jede Pflanze das Pflanzengewebe, enthaltend photosynthe-tisch inaktive Plastide, also vorzugsweise Blüte, Frucht oder Knolle, zu wählen in dem im Wildtyp bereits der höchste Gesamtcarotinoid-Gehalt vorliegt.

Unter dem Begriff "Wildtyp" wird erfindungsgemäß die entsprechende nicht genetisch veränderte Ausgangspflanze verstanden.

5 Je nach Zusammenhang kann unter dem Begriff "Pflanze" die Ausgangspflanze (Wildtyp) oder eine erfindungsgemäße, genetisch veränderte Pflanze oder beides verstanden werden.

Vorzugsweise und insbesondere in Fällen, in denen die Pflanze oder der Wildtyp nicht eindeutig zugeordnet werden kann, wird unter "Wildtyp" für die Erhöhung der
10 β -Cyclase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Reduzierung der endogenen β -Hydroxylase Aktivität, für die nachstehend beschriebene Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität und die Erhöhung des Gehalts an β -Carotinoiden jeweils eine Referenzpflanze verstanden.

15 Diese Referenzpflanze ist für Pflanzen, die als Wildtyp in Blüten den höchsten Gehalt an Carotinoiden aufweisen vorzugsweise *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Tagetes lucida*, *Tagetes pringlei*, *Tagetes palmeri*, *Tagetes minuta* oder *Tagetes campanulata*, besonders bevorzugt *Tagetes erecta*.

20 Diese Referenzpflanze ist für Pflanzen, die als Wildtyp in Früchten den höchsten Gehalt an Carotinoiden, vorzugsweise Mais.

25 Diese Referenzpflanze ist für Pflanzen, die als Wildtyp in Knollen den höchsten Gehalt an Carotinoiden, vorzugsweise *Solanum tuberosum*.

Die Erhöhung der β -Cyclase-Aktivität kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Translations- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression einer
30 Nukleinsäure codierend eine β -Cyclase gegenüber dem Wildtyp, beispielsweise durch Induzierung des β -Cyclase-Gens durch Aktivatoren oder starke Promotoren oder durch Einbringen von Nukleinsäuren kodierend eine β -Cyclase in die Pflanze.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der β -Cyclase-Aktivität
35 gegenüber dem Wildtyp durch die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, gegenüber dem Wildtyp.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine β -Cyclase durch Einbringen von Nukleinsäuren, die β -Cyclasen kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, in die Pflanze.

In den erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen liegt also in dieser Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres β -Cyclase-Gen unter der Kontrolle eines Promotors, der die Expression des β -Cyclase-Gens in Pflanzengeweben enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide gewährleistet, vor, kodierend eine β -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist. In dieser Ausführungsform weist die erfindungsgemäße genetisch veränderte Pflanze in Pflanzengeweben, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, dementsprechend mindestens eine exogene (=heterologe) β -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, auf oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, codierend eine β -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, auf.

Dazu prinzipiell jedes erfindungsgemäße β -Cyclase-Gen, also jede Nukleinsäuren die eine β -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, codiert verwendet werden.

Alle in der Beschreibung erwähnten Nukleinsäuren können beispielsweise eine RNA-, DNA- oder cDNA-Sequenz sein.

Bei genomischen β -Cyclase-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall das die Wirtspflanze nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden β -Cyclase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

Beispiele für Nukleinsäuren, kodierend eine β -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, und die entsprechenden β -Cyclasen, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können, sind beispielsweise Sequenzen aus

Tomate (Bgene; WO 00/08920; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 1, Protein SEQ ID NO: 2).

Weitere natürliche Beispiele für β -Cyclasen und β -Cyclase-Gene, die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können, lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Identitätsvergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit den vorstehend beschriebenen Sequenzen und insbesondere mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 leicht auffinden.

Weitere natürliche Beispiele für β -Cyclasen und β -Cyclase-Gene lassen sich weiterhin ausgehend von den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, insbesondere ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 1 aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungstechniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

Die im folgenden verwendeten Parameter und Bedingungen für Identitätsvergleiche und Hybridisierungstechniken gelten analog auch für alle weiteren, nachstehend beschriebenen Nukleinsäuren und Proteine, die in bevorzugten Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens oder der genetisch veränderten Pflanzen verwendet werden.

Die Hybridisierung kann unter moderaten (geringe Stringenz) oder vorzugsweise unter stringenten (hohe Stringenz) Bedingungen erfolgen.

Solche Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise bei Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., in: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 beschrieben.

Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrilles ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit geringer Stringenz (mit 2X SSC bei 50°C) und solchen mit hoher Stringenz (mit 0.2X SSC bei 50°C, bevorzugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3 M Natriumcitrat, 3 M Natriumchlorid, pH 7.0).

5

Darüberhinaus kann die Temperatur während des Waschschrilles von moderaten Bedingungen bei Raumtemperatur, 22°C, bis zu stringenten Bedingungen bei 65°C angehoben werden.

- 10 Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden. Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50 % Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt.

15

Einige beispielhafte Bedingungen für Hybridisierung und Waschschrift sind infolge gegeben:

(1) Hybridisierungsbedingungen mit zum Beispiel

20

(i) 4X SSC bei 65°C, oder

(ii) 6X SSC bei 45°C, oder

25

(iii) 6X SSC bei 68°C, 100 mg/ml denaturierter Fischsperma-DNA, oder

(iv) 6X SSC, 0.5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA bei 68°C, oder

30

(v) 6XSSC, 0.5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA, 50 % Formamid bei 42°C, oder

(vi) 50 % Formamid, 4X SSC bei 42°C, oder

35

(vii) 50 % (vol/vol) Formamid, 0.1 % Rinderserumalbumin, 0.1 % Ficoll, 0.1 % Polyvinylpyrrolidon, 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 6.5, 750 mM NaCl, 75 mM Natriumcitrat bei 42°C, oder

(viii) 2X oder 4X SSC bei 50°C (moderate Bedingungen), oder

(ix) 30 bis 40 % Formamid, 2X oder 4X SSC bei 42° (moderate Bedingungen).

5 (2) Waschschritte für jeweils 10 Minuten mit zum Beispiel

(i) 0.015 M NaCl/0.0015 M Natriumcitrat/0.1 % SDS bei 50°C, oder

(ii) 0.1X SSC bei 65°C, oder

10

(iii) 0.1X SSC, 0.5 % SDS bei 68°C, oder

(iv) 0.1X SSC, 0.5 % SDS, 50 % Formamid bei 42°C, oder

15

(v) 0.2X SSC, 0.1 % SDS bei 42°C, oder

(vi) 2X SSC bei 65°C (moderate Bedingungen).

20

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren bringt man Nukleinsäuren ein, die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 65 %, vorzugsweise mindestens 70 %, bevorzugter mindestens 75 %, bevorzugter mindestens 80 %, bevorzugter mindestens 85 %, bevorzugter mindestens 90 %, bevorzugter mindestens 95 %, besonders bevorzugt mindestens 97 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 und die enzymatische Eigenschaft einer β -Cyclase aufweist.

25

30

Dabei kann es sich um eine natürliche β -Cyclase-Sequenz handeln, die wie vorstehend beschrieben durch Identitätsvergleich der Sequenzen oder mit Hybridisierungstechniken aus anderen Organismen gefunden werden kann oder um eine künstliche β -Cyclase-Sequenz die ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 2 durch künstliche Variation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgewandelt wurde.

35

Unter dem Begriff "Substitution" ist in der Beschreibung der Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren durch eine oder mehrere Aminosäuren zu verstehen. Bevorzugt werden sog. konservative Austausche durchgeführt, bei denen die ersetzte Aminosäure eine ähnliche Eigenschaft hat wie die ursprüngliche Aminosäure, bei-

spielsweise Austausch von Glu durch Asp, Gln durch Asn, Val durch Ile, Leu durch Ile, Ser durch Thr.

5 Deletion ist das Ersetzen einer Aminosäure durch eine direkte Bindung. Bevorzugte Positionen für Deletionen sind die Termini des Polypeptides und die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Proteindomänen.

10 Insertionen sind Einfügungen von Aminosäuren in die Polypeptidkette, wobei formal eine direkte Bindung durch ein oder mehrere Aminosäuren ersetzt wird.

Unter Identität zwischen zwei Proteinen wird die Identität der Aminosäuren über die jeweils gesamte Proteinelänge verstanden, insbesondere die Identität die durch Vergleich mit Hilfe der Lasergene Software der Firma DNASTAR, inc. Madison, Wisconsin (USA) unter Anwendung der Clustal Methode (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl. Biosci. 15 1989 Apr;5(2):151-1) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Multiple alignment parameter:

20 Gap penalty 10
Gap length penalty 10

Pairwise alignment parameter:

25 K-tuple 1
Gap penalty 3
Window 5
Diagonals saved 5

30 Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit einer bestimmten Sequenz aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der bestimmten Sequenz insbesondere nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 20 % aufweist.

35 Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 insbesondere nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 60 % aufweist.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

5 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

10 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 1 in die Pflanze ein.

Alle vorstehend erwähnten β -Cyclase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann
15 beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, S. 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in
20 Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

Im erfindungsgemäßen Verfahren erfolgt die Expression der β -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution,
25 Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, unter Kontrolle von Regulationssignalen, vorzugsweise einem Promotor und plastidären Transitpeptiden, die die Expression der β -Cyclase in den Pflanzengeweben, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, gewährleisten.

30 In einer bevorzugten Ausführungsform verwendet man genetisch veränderte Pflanzen, die in Pflanzengeweben, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, die höchste Expressionsrate der β -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, aufweisen.
35

Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, dass die Expression der erfindungsgemäßen β -Cyclase unter Kontrolle eines für das Pflanzengewebe spezifischen Promotors
40 erfolgt.

Für den vorstehend beschriebenen Fall, dass die Expression in Blüten erfolgen soll ist es vorteilhaft, dass die Expression der erfindungsgemäßen β -Cyclase unter Kontrolle eines blütenspezifischen oder bevorzugter petalenspezifischen Promotors erfolgt.

5

Für den vorstehend beschriebenen Fall, dass die Expression in Früchten erfolgen soll ist es vorteilhaft, dass die Expression der erfindungsgemäßen β -Cyclase unter Kontrolle eines fruchtspezifischen Promotors erfolgt.

10

Für den vorstehend beschriebenen Fall, dass die Expression in Knollen erfolgen soll ist es vorteilhaft, dass die Expression der erfindungsgemäßen β -Cyclase unter Kontrolle eines knollenspezifischen Promotors erfolgt.

15

In einer bevorzugten Ausführungsform werden genetisch veränderte Pflanzen kultiviert, die gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen.

Unter Hydroxylase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer β -Carotin-Hydroxylase verstanden, die im folgenden Hydroxylase genannt wird.

20

Unter einer Hydroxylase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, gegebenenfalls substituierten, β -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Hydroxy-Gruppe einzuführen.

25

Insbesondere wird unter einer Hydroxylase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, β -Carotin in Zeaxanthin umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Hydroxylase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase umgesetzte Menge β -Carotin bzw. gebildete Menge Zeaxanthin verstanden.

30

Bei einer erhöhten Hydroxylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase die umgesetzte Menge β -Carotin bzw. die gebildete Menge Zeaxanthin erhöht.

35

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Hydroxylase-Aktivität des Wildtyps.

Unter der nachstehend beschriebenen "endogenen β -Hydroxylase" wird die pflanzen-eigene, endogene Hydroxylase verstanden. Die Bestimmung der Aktivität erfolgt analog.

- 5 Die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

- 10 Die Aktivität der Hydroxylase wird nach Bouvier et al. (Biochim. Biophys. Acta 1391 (1998), 320-328) *in vitro* bestimmt. Es wird zu einer bestimmten Menge an Pflanzenextrakt Ferredoxin, Ferredoxin-NADP Oxidoreductase, Katalase, NADPH sowie beta-Carotin mit Mono- und Digalaktosylglyzeriden zugegeben.

- 15 Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität unter folgenden Bedingungen nach Bouvier, Keller, d'Harlingue und Camara (Xanthophyll biosynthesis: molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (*Capsicum annuum* L.; Biochim. Biophys. Acta 1391 (1998), 320-328):

- 20 Der in-vitro Assay wird in einem Volumen von 0.250 ml Volumen durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), 0.025 mg Ferredoxin von Spinat, 0.5 Einheiten Ferredoxin-NADP+ Oxidoreduktase von Spinat, 0.25 mM NADPH, 0.010 mg beta-Carotin (in 0.1 mg Tween 80 emulgiert), 0.05 mM einer Mischung von Mono- und Digalaktosylglyzeriden (1:1), 1 Einheit Katalase, 200 Mono- und Digalaktosylglyzeriden, (1:1), 0.2 mg Rinderserumalbumin und Pflanzenextrakt in unterschiedlichem Volumen. Die Reaktionsmischung wird 2 Stunden bei 30°C inkubiert.
- 25 Die Reaktionsprodukte werden mit organischem Lösungsmittel wie Aceton oder Chloroform/Methanol (2:1) extrahiert und mittels HPLC bestimmt.

- 30 Die Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Expressions- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression von Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxylase gegenüber dem Wildtyp.

- 35 Die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxylase gegenüber dem Wildtyp kann ebenfalls durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Induzierung des Hydroxylase-Gens durch Aktivatoren oder durch Einbringen von einer oder mehrerer Hydroxylase-Genkopien, also durch Einbringen mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase in die Pflanze.

Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Hydroxylase wird erfindungsgemäß auch die Manipulation der Expression der Pflanzen eigenen, endogenen Hydroxylase verstanden.

5 Dies kann beispielsweise durch Veränderung der Promotor DNA-Sequenz für Hydroxylasen kodierende Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine erhöhte Expressionsrate des Gens zur Folge hat, kann beispielsweise durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

10 Es ist, wie vorstehend beschrieben, möglich, die Expression der endogenen Hydroxylase durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdsubstanzen erfolgen.

15 Des weiteren kann eine veränderte bzw. erhöhte Expression eines endogenen Hydroxylase-Gens dadurch erzielt werden, dass ein in der nicht transformierten Pflanze nicht vorkommendes Regulator-Protein mit dem Promotor dieses Gens in Wechselwirkung tritt.

20 Solch ein Regulator kann ein chimäres Protein darstellen, welches aus einer DNA-Bindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne besteht, wie beispielsweise in WO 96/06166 beschrieben.

Bei bestimmten bevorzugten Pflanzen, bei denen der Schwerpunkt der Biosynthese auf dem α -Carotinoid-Weg liegt, wie beispielsweise Pflanzen der Gattung Tagetes, ist es vorteilhaft, die endogene β -Hydroxylase-Aktivität zu reduzieren und die Aktivität von exogenen Hydroxylasen zu erhöhen.

30 In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Hydroxylase durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure codierend eine Hydroxylase in die Pflanze.

Dazu kann prinzipiell jedes Hydroxylase-Gen, also jede Nukleinsäure, die eine Hydroxylase codiert, verwendet werden.

35 Bei genomischen Hydroxylase-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall das die Wirtspflanze nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechende Hydroxylase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

40

Beispiele für ein Hydroxylase-Gene sind:

5 eine Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase aus *Haematococcus pluvialis*, Accession AX038729, WO 0061764); (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 3, Protein: SEQ ID NO: 4),

sowie Hydroxylasen der folgenden Accession Nummern:

10 lembI CAB55626.1, CAA70427.1, CAA70888.1, CAB55625.1, AF499108_1, AF315289_1, AF296158_1, AAC49443.1, NP_194300.1, NP_200070.1, AAG10430.1, CAC06712.1, AAM88619.1, CAC95130.1, AAL80006.1, AF162276_1, AAO53295.1, AAN85601.1, CRTZ_ERWHE, CRTZ_PANAN, BAB79605.1, CRTZ_ALCSP, CRTZ_AGRAU, CAB56060.1, ZP_00094836.1, AAC44852.1, BAC77670.1, NP_745389.1, NP_344225.1, NP_849490.1, ZP_00087019.1, NP_503072.1, 15 NP_852012.1, NP_115929.1, ZP_00013255.1

Eine besonders bevorzugte Hydroxylase ist weiterhin die Hydroxylase aus Tomate (Acc.No. LEY14810) (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 5; Protein: SEQ ID NO. 6).

20 In den erfindungsgemäßen bevorzugten transgenen Pflanzen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres Hydroxylase-Gen vor.

25 In dieser bevorzugten Ausführungsform weist die genetisch veränderte Pflanze beispielsweise mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase auf.

30 Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Hydroxylase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 6 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 6, und die die enzymatische Eigenschaft 35 einer Hydroxylase aufweisen.

Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder

der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID NO: 6 leicht auffinden.

5 Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 5 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

10 In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Hydroxylase der Sequenz SEQ ID NO: 6.

15 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

20 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

25 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 5 in den Organismus ein.

30 Alle vorstehend erwähnten Hydroxylase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

35 Vorzugsweise erfolgt die Expression der Hydroxylase im erfindungsgemäßen Verfahren unter Kontrolle von Regulationssignalen, vorzugsweise einem Promotor und plastidären Transitpeptiden, die die Expression der Hydroxylase in den Pflanzengewebe, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, gewährleisten.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform verwendet man genetisch veränderte Pflanzen, die in Pflanzengeweben, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, die höchste Expressionsrate der Hydroxylase aufweisen.

- 5 Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, dass die Expression der Hydroxylase unter Kontrolle eines für das Pflanzengewebe spezifischen Promotors erfolgt.

- 10 Für den vorstehend beschriebenen Fall, dass die Expression in Blüten erfolgen soll ist es vorteilhaft, dass die zusätzliche Expression der Hydroxylase unter Kontrolle eines blütenspezifischen oder bevorzugter petalenspezifischen Promotors erfolgt.

- 15 Für den vorstehend beschriebenen Fall, dass die Expression in Früchten erfolgen soll ist es vorteilhaft, dass die zusätzliche Expression der Hydroxylase unter Kontrolle eines fruchtspezifischen Promotors erfolgt.

- 20 Für den vorstehend beschriebenen Fall, dass die Expression in Knollen erfolgen soll ist es vorteilhaft, dass die zusätzliche Expression der Hydroxylase unter Kontrolle eines knollenspezifischen Promotors erfolgt.

- 25 In einer weiter bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens weisen die genetisch veränderten Pflanzen gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe ϵ -Cyclase-Aktivität und endogene β -Hydroxylase Aktivität auf.

- 30 Unter ϵ -Cyclase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer ϵ -Cyclase verstanden.

- Unter einer ϵ -Cyclase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, einen endständigen, linearen Rest von Lycopin in einen ϵ -Ionon-Ring zu überführen.

- 35 Unter einer ϵ -Cyclase wird daher insbesondere ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Lycopin in δ -Carotin umzuwandeln.

- Dementsprechend wird unter ϵ -Cyclase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein ϵ -Cyclase umgesetzte Menge Lycopin bzw. gebildete Menge δ -Carotin verstanden.

- 40 Bei einer reduzierten ϵ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein ϵ -Cyclase die umgesetzte Menge Lycopin bzw. die gebildete Menge δ -Carotin reduziert.

Die Bestimmung der ϵ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

5

Die ϵ -Cyclase-Aktivität kann nach Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15) *in vitro* bestimmt werden, wenn zu einer bestimmten Menge an Pflanzenextrakt Kaliumphosphat als Puffer (pH 7.6), Lycopin als Substrat, Stroma-

10

protein von Paprika, NADP⁺, NADPH und ATP zugegeben werden.
Die Bestimmung der ϵ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt besonders bevorzugt nach Bouvier, d'Harlingue und Camara (Molecular Analysis of carotenoid cyclase inhibition; Arch. Biochem. Biophys. 346(1) (1997) 53-64):

15

Der *in-vitro* Assay wird in einem Volumen von 0.25 ml durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), unterschiedliche Mengen an Pflanzenextrakt, 20 nM Lycopin, 0.25 mg an chromoplastidärem Stroma-protein aus Paprika, 0.2 mM NADP⁺, 0.2 mM NADPH und 1 mM ATP. NADP/NADPH und ATP werden in 0.01 ml Ethanol mit 1 mg Tween 80 unmittelbar vor der Zugabe zum Inkubationsmedium gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 30°C wird die Reaktion durch Zugabe von Chloroform/Methanol (2:1) beendet. Die in Chloroform extrahierten Reaktionsprodukte werden mittels HPLC analysiert.

20

25

Ein alternativer Assay mit radioaktivem Substrat ist beschrieben in Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15). Eine weitere analytische Methode ist beschrieben in Beyer, Kröncke und Nievelstein (On the mechanism of the lycopene isomerase/cyclase reaction in *Narcissus pseudonarcissus* L. chromoplast, J. Biol. Chem. 266(26) (1991) 17072-17078).

30

Unter endogener β -Hydroxylase -Aktivität wird die Enzymaktivität der endogenen, pflanzeneigenen β -Hydroxylase verstanden.

35

Unter einer endogenen β -Hydroxylase wird eine endogene, pflanzeneigene Hydroxylase wie vorstehend beschrieben, verstanden. Ist beispielsweise *Tagetes erecta* die genetisch zu verändernde Zielpflanze, so wird unter der endogenen β -Hydroxylase die β -Hydroxylase von *Tagetes erecta* verstanden.

Unter einer endogenen β -Hydroxylase wird demnach insbesondere ein pflanzen-eigenes Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, β -Carotin in Zeaxanthin umzuwandeln.

- 5 Dementsprechend wird unter endogener β -Hydroxylase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein endogene β -Hydroxylase umgesetzte Menge β -Carotin bzw. gebildete Menge Zeaxanthin verstanden.

- 10 Bei einer reduzierten endogenen β -Hydroxylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit die durch das Protein endogene β -Hydroxylase umgesetzte Menge β -Carotin bzw. die gebildete Menge Zeaxanthin reduziert.

- 15 Vorzugsweise beträgt diese Reduzierung der endogenen β -Hydroxylase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt 100 %. Besonders bevorzugt ist die endogenen β -Hydroxylase-Aktivität komplett ausgeschaltet.

- 20 Es wurde überraschenderweise gefunden, dass es bei Pflanzen die mehrheitlich Carotinoide des α -Carotin-Weges, wie beispielsweise Lutein, herstellen, wie beispielsweise Pflanzen der Gattung Tagetes, vorteilhaft ist, die Aktivität der endogenen β -Hydroxylase zu reduzieren und gegebenenfalls die Aktivität einer heterologen Hydroxylase zu erhöhen. Besonders bevorzugt werden dabei Hydroxylasen oder funktionelle Äquivalente davon verwendet, die aus Pflanzen stammen, die mehrheitlich Carotinoide des β -Carotin-Weges herstellen, wie beispielsweise die vorstehend beschriebene β -Hydroxylase aus Tomate (Nukleinsäure: SEQ ID No. 5, Protein: SEQ ID No. 6).

- 30 Können wir das hier schon antizipieren?

Die Bestimmung der endogenen β -Hydroxylase Aktivität erfolgt wie vorstehend beschrieben analog zur Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität.

- 35 Unter einer reduzierten ε -Cyclase-Aktivität bzw. Hydroxylase-Aktivität wird vorzugsweise die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Funktionalität einer ε -Cyclase bzw. Hydroxylase in einer pflanzlichen Zelle, Pflanze oder einem davon abgeleiteten Teil, Gewebe, Organ, Zellen oder Samen verstanden.

Die Reduzierung der erfindungsgemäßen Enzym-Aktivitäten in Pflanzen gegenüber dem Wildtyp kann beispielsweise durch Reduzierung der Proteinmenge, oder der mRNA-Menge in der Pflanze erfolgen. Dementsprechend kann eine gegenüber dem Wildtyp reduzierte Enzym-Aktivität direkt bestimmt werden oder über die Bestimmung
5 der Proteinmenge oder der mRNA-Menge der erfindungsgemäßen Pflanze im Vergleich zum Wildtyp erfolgen.

Eine Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität umfasst eine mengenmäßige Verringerung einer ϵ -Cyclase bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen der ϵ -Cyclase
10 (d.h. fehlende Nachweisbarkeit von ϵ -Cyclase-Aktivität oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit der ϵ -Cyclase). Vorzugsweise wird die ϵ -Cyclase-Aktivität (bzw. die ϵ -Cyclase-Proteinmenge oder die ϵ -Cyclase-mRNA-Menge) in der Pflanze, besonders bevorzugt in Blüten im Vergleich zum Wildtyp um mindestens 5 %, weiter bevorzugt um mindestens 20 %, weiter bevorzugt um mindestens 50 %, weiter bevorzugt um
15 100 % reduziert. Insbesondere meint "Reduzierung" auch das vollständigen Fehlen der ϵ -Cyclase-Aktivität (bzw. des ϵ -Cyclase-Proteins oder der ϵ -Cyclase-mRNA).

Eine Reduzierung der endogenen β -Hydroxylase-Aktivität umfasst eine mengenmäßige Verringerung einer endogenen β -Hydroxylase bis hin zu einem im wesentlichen
20 vollständigen Fehlen der endogenen β -Hydroxylase (d.h. fehlende Nachweisbarkeit von endogener β -Hydroxylase-Aktivität oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit der endogenen β -Hydroxylase). Vorzugsweise wird die endogene β -Hydroxylase-Aktivität (bzw. die endogenen β -Hydroxylase-Proteinmenge oder die endogenen β -Hydroxylase-mRNA-Menge) in der Pflanze, besonders bevorzugt in Blüten im
25 Vergleich zum Wildtyp um mindestens 5 %, weiter bevorzugt um mindestens 20 %, weiter bevorzugt um mindestens 50 %, weiter bevorzugt um 100 % reduziert. Insbesondere meint "Reduzierung" auch das vollständigen Fehlen der endogenen β -Hydroxylase-Aktivität (bzw. des endogenen β -Hydroxylase-Proteins oder der endogenen β -Hydroxylase-mRNA).

30

Vorzugsweise erfolgt die Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität und/oder der endogenen β -Hydroxylase Aktivität in Pflanzen durch mindestens eines der nachfolgenden Verfahren:

- 35 a) Einbringen mindestens einer doppelsträngigen ϵ -Cyclase- Ribonukleinsäuresequenz und/oder endogenen β -Hydroxylase-Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen. Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die dsRNA

gegen ein Gen (also genomische DNA-Sequenzen wie die Promotorsequenz) oder ein Transkript (also mRNA-Sequenzen) gerichtet ist,

- 5 b) Einbringen mindestens einer ϵ -Cyclase-antisense-Ribonukleinsäuresequenz und/oder endogenen β -Hydroxylase-antisense-Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen. Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die antisenseRNA gegen ein Gen (also genomische DNA-Sequenzen) oder ein Gentranskript (also RNA-Sequenzen) gerichtet ist. Umfasst sind auch α -anomere Nukleinsäuresequenzen,
- 10
- c) Einbringen mindestens einer ϵ -Cyclase-antisense-Ribonukleinsäuresequenz und/oder endogenen β -Hydroxylase-antisense-Ribonukleinsäuresequenz jeweils kombiniert mit einem Ribozym oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen,
- 15
- d) Einbringen mindestens einer ϵ -Cyclase-sense-Ribonukleinsäuresequenz und/oder endogenen β -Hydroxylase-sense-Ribonukleinsäuresequenz zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen,
- 20
- e) Einbringen mindestens eines DNA-oder Protein-bindenden Faktors gegen ein ϵ -Cyclase-Gen, -RNA oder -Protein und/oder endogenes β -Hydroxylase-Gen, -RNA oder -Protein oder einer dessen Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen,
- 25
- f) Einbringen mindestens einer den ϵ -Cyclase-RNA und/oder endogenen β -Hydroxylase-RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenz oder Nukleinsäuresequenzen oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen,
- 30
- g) Einbringen mindestens eines Konstruktes zur Erzeugung einer Insertion, Deletion, Inversion oder Mutation in einem ϵ -Cyclase-Gen und/oder endogenem β -Hydroxylase-Gen in Pflanzen. Die Methode umfasst das Einbringen mindestens eines Konstruktes zur Erzeugung eines Funktionsverlustes, wie beispielsweise die Generierung von Stopp-Kodons oder eine Verschiebungen im Leserahmen, an einem Gen beispielsweise durch Erzeugung einer Insertion, Deletion, Inversion oder Mutation in einem Gen. Bevorzugt können Knockout-Mutanten mittels gezielter Insertion in besagtes Gen durch homologe Rekombination oder
- 35

Einbringen von sequenzspezifischen Nukleasen gegen die entsprechenden Gensequenzen generiert werden.

Dem Fachmann ist bekannt, dass auch weitere Verfahren im Rahmen der vorliegenden Erfindung zur Verminderung einer ϵ -Cyclase und/oder endogenen β -Hydroxylase bzw. seiner Aktivität oder Funktion eingesetzt werden können. Beispielsweise kann auch das Einbringen einer dominant-negativen Variante einer ϵ -Cyclase bzw. endogenen β -Hydroxylase oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette vorteilhaft sein. Dabei kann jedes einzelne dieser Verfahren eine Verminderung der Proteinmenge, mRNA-Menge und/oder Aktivität einer ϵ -Cyclase bzw. endogenen β -Hydroxylase bewirken. Auch eine kombinierte Anwendung ist denkbar. Weitere Methoden sind dem Fachmann bekannt und können die Behinderung oder Unterbindung der Prozessierung der ϵ -Cyclase bzw. endogenen β -Hydroxylase, des Transports der ϵ -Cyclase bzw. endogenen β -Hydroxylase oder deren mRNAs, Hemmung der Ribosomenanlagerung, Hemmung des RNA-Spleißens, Induktion eines ϵ -Cyclase-RNA bzw. endogenen β -Hydroxylase-RNA abbauenden Enzyms und/oder Hemmung der Translationselongation oder -termination umfassen.

Die einzelnen bevorzugten Verfahren seien infolge durch beispielhafte Ausführungsformen beschrieben:

- a) Einbringen einer doppelsträngigen ϵ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenz (ϵ -Cyclase-dsRNA) bzw. doppelsträngigen endogenen β -Hydroxylase-Ribonukleinsäuresequenz (endogene β -Hydroxylase-dsRNA)

Das Verfahren der Genregulation mittels doppelsträngiger RNA ("double-stranded RNA interference"; dsRNAi) ist bekannt und beispielsweise in Matzke MA et al. (2000) Plant Mol Biol 43:401-415; Fire A. et al (1998) Nature 391:806-811; WO 99/32619; WO 99/53050; WO 00/68374; WO 00/44914; WO 00/44895; WO 00/49035 oder WO 00/63364 beschrieben. Auf die in den angegebenen Zitaten beschriebenen Verfahren und Methoden wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen.

Unter "Doppelsträngiger Ribonukleinsäuresequenz" wird erfindungsgemäß eine oder mehr Ribonukleinsäuresequenzen, die aufgrund komplementärer Sequenzen theoretisch, beispielsweise gemäß den Basenpaarregeln von Waston und Crick und/oder faktisch, beispielsweise aufgrund von Hybridisierungsexperimenten, in vitro und/oder in vivo in der Lage sind, doppelsträngige RNA-Strukturen auszubilden.

Dem Fachmann ist bewusst, dass die Ausbildung von doppelsträngigen RNA-Strukturen, einen Gleichgewichtszustand darstellt. Bevorzugt ist das Verhältnis von

doppelsträngigen Molekülen zu entsprechenden dissoziierten Formen mindestens 1 zu 10, bevorzugt 1:1, besonders bevorzugt 5:1, am meisten bevorzugt 10:1.

- Unter einer doppelsträngigen ϵ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenz oder auch
- 5 ϵ -Cyclase-dsRNA wird vorzugsweise ein RNA-Molekül verstanden, das einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die
- 10 a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder
- b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist.
- 15 Im erfindungsgemäßen Verfahren bringt man daher zur Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität bevorzugt in die Pflanze eine RNA ein, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die
- 20 a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder
- b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist.
- 25 Unter dem Begriff " ϵ -Cyclase-Transkript" wird der transkribierte Teil eines ϵ -Cyclase-Gens verstanden, der neben der ϵ -Cyclase kodierenden Sequenz beispielsweise auch nichtkodierende Sequenzen, wie beispielsweise auch UTRs enthält.
- Unter einer RNA, die "mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist", ist vorzugsweise gemeint, dass die RNA-Sequenz
- 30 mit mindestens einem Teil des theoretischen Transkriptes der ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenz, also der entsprechenden RNA-Sequenz, identisch ist.
- Unter "einem Teil" des Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Transkripts bzw. der Pflanze
- 35 eigenen ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenz werden Teilsequenzen verstanden, die von wenigen Basenpaaren bis hin zu vollständigen Sequenzen des Transkripts bzw. der Promotorsequenz reichen können. Die optimale Länge der Teilsequenzen kann der Fachmann durch Routineversuche leicht ermitteln.

Unter einer doppelsträngigen endogenen β -Hydroxylase-Ribonukleinsäuresequenz oder auch endogene β -Hydroxylase-dsRNA wird vorzugsweise ein RNA-Molekül verstanden, das einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

5

a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen, endogenen β -Hydroxylase-Transkripts identisch ist und/oder

10

b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen, endogenen β -Hydroxylase-Promotor-Sequenz identisch ist.

15

Im erfindungsgemäßen Verfahren bringt man daher zur Reduzierung der endogenen β -Hydroxylase-Aktivität bevorzugt in die Pflanze eine RNA ein, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen, endogenen β -Hydroxylase-Transkripts identisch ist und/oder

20

b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen, endogenen β -Hydroxylase-Promotor-Sequenz identisch ist.

25

Unter dem Begriff "endogene β -Hydroxylase-Transkript" wird der transkribierte Teil eines endogenen β -Hydroxylase-Gens verstanden, der neben der endogenen β -Hydroxylase kodierenden Sequenz beispielsweise auch nichtkodierende Sequenzen, wie beispielsweise auch UTRs enthält.

30

Unter einer RNA, die "mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen, endogenen β -Hydroxylase-Promotor-Sequenz identisch ist", ist vorzugsweise gemeint, dass die RNA-Sequenz mit mindestens einem Teil des theoretischen Transkriptes der endogenen β -Hydroxylase-Promotor-Sequenz, also der entsprechenden RNA-Sequenz, identisch ist.

35

Unter "einem Teil" des Pflanze eigenen, endogenen β -Hydroxylase-Transkripts bzw. der Pflanze eigenen endogenen β -Hydroxylase-Promotor-Sequenz werden Teilsequenzen verstanden, die von wenigen Basenpaaren bis hin zu vollständigen Sequenzen des Transkripts bzw. der Promotorsequenz reichen können. Die optimale Länge der Teilsequenzen kann der Fachmann durch Routineversuche leicht ermitteln.

- In der Regel beträgt die Länge der Teilsequenzen mindestens 10 Basen und höchstens 2 kb, bevorzugt mindestens 25 Basen und höchstens 1,5 kb, besonders bevorzugt mindestens 50 Basen und höchstens 600 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens 100 Basen und höchstens 500, am meisten bevorzugt mindestens 200 Basen oder mindestens 300 Basen und höchstens 400 Basen.

- Vorzugsweise werden die Teilsequenzen so ausgesucht, dass eine möglichst hohe Spezifität erreicht wird und nicht Aktivitäten anderer Enzyme reduziert werden, deren Verminderung nicht erwünscht ist. Es ist daher vorteilhaft für die Teilsequenzen der dsRNA Teile der Transkripte und/oder Teilsequenzen der Promotor-Sequenzen zu wählen, die nicht in anderen Aktivitäten auftreten.

- In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält daher die dsRNA eine Sequenz, die mit einem Teil der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Transkripts bzw. endogenen β -Hydroxylase Transkripts identisch ist und das 5'-Ende oder das 3'-Ende der Pflanze eigenen Nukleinsäure, codierend eine ϵ -Cyclase bzw. endogene β -Hydroxylase enthält. Insbesondere sind nichttranslatierte Bereiche im 5' oder 3' des Transkriptes geeignet, selektive Doppel-Strang-Strukturen herzustellen.
- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung bezieht sich auf doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA-Moleküle), die bei Einbringen in einen pflanzlichen Organismus (oder eine davon abgeleitete Zelle, Gewebe, Organ oder Vermehrungsmaterial) die Verminderung einer ϵ -Cyclase bzw. einer endogenen β -Hydroxylase bewirken.
- Ein doppelsträngiges RNA-Molekül zur Reduzierung der Expression einer ϵ -Cyclase (ϵ -Cyclase-dsRNA) umfasst dabei bevorzugt
- einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil eines "sense"-RNA- ϵ -Cyclase Transkriptes, und
 - einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen, bevorzugt vollständig, komplementären ist.
- Zur Transformation der Pflanze mit einer endogenen β -Hydroxylase-dsRNA wird bevorzugt ein Nukleinsäurekonstrukt verwendet, das in die Pflanze eingebracht wird und das in der Pflanze in die endogenen β -Hydroxylase-dsRNA transkribiert wird.

Ein doppelsträngige RNA-Molekül zur Reduzierung der Expression einer endogenen β -Hydroxylase (endogenen β -Hydroxylase-dsRNA) umfasst dabei bevorzugt

- 5 a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil eines "sense"-RNA-endogenen β -Hydroxylase Transkriptes, und
- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen, bevorzugt vollständig, komplementären ist.

10

Zur Transformation der Pflanze mit einer endogenen β -Hydroxylase-dsRNA wird bevorzugt ein Nukleinsäurekonstrukt verwendet, das in die Pflanze eingebracht wird und das in der Pflanze in die endogene β -Hydroxylase-dsRNA transkribiert wird.

15

Diese Nukleinsäurekonstrukte werden im folgenden auch Expressionskassetten oder Expressionsvektoren genannt.

20

In Bezug auf die dsRNA-Moleküle wird unter ϵ -Cyclase-Nukleinsäuresequenz, bzw. das entsprechende Transkript für die bevorzugte Pflanze *Tagetes erecta* bevorzugt die Sequenz gemäß SEQ ID NO: 8 oder ein Teil derselben verstanden.

25

In Bezug auf die dsRNA-Moleküle wird unter endogener β -Hydroxylase-Nukleinsäuresequenz, bzw. das entsprechende Transkript für die bevorzugte Pflanze *Tagetes erecta* bevorzugt die Sequenz gemäß SEQ ID NO: 16 oder ein Teil derselben verstanden.

30

"Im wesentlichen identisch" meint, dass die dsRNA Sequenz auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zur Zielsequenz aufweisen kann und dennoch eine effizient Verminderung der Expression bewirkt. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 75 %, bevorzugt mindestens 80 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 90 % am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "sense"-Strang einer inhibitorischen dsRNA und mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes, bzw. zwischen dem "antisense"-Strang dem komplementären Strang des entsprechenden Gens.

35

Eine 100%ige Sequenzidentität zwischen dsRNA und einem Gentranskript ist nicht zwingend erforderlich, um eine effiziente Verminderung der Protein Expression zu bewirken. Demzufolge besteht der Vorteil, dass das Verfahren tolerant ist gegenüber Sequenzabweichungen, wie sie infolge genetischer Mutationen, Polymorphismen oder evolutionärer Divergenzen vorliegen können. So ist es beispielsweise möglich mit der

40

dsRNA, die ausgehend von der ϵ -Cyclase Sequenz bzw. endogenen β -Hydroxylase-Sequenz des einen Organismus generiert wurde, die ϵ -Cyclase Expression bzw. endogene β -Hydroxylase Expression in einem anderen Organismus zu unterdrücken. Zu diesem Zweck umfasst die dsRNA bevorzugt Sequenzbereiche Gentranskripten, die konservierten Bereichen entsprechen. Besagte konservierte Bereiche können aus Sequenzvergleichen leicht abgeleitet werden.

"Im wesentlichen komplementär" meint, dass der "antisense"-RNA-Strang auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges aufweisen kann. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 80 %, bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 95 %, am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "antisense"-RNA-Strang und dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges.

In einer weiteren Ausführungsform umfasst die ϵ -Cyclase-dsRNA

- a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil der Promotorsequenz eines ϵ -Cyclase-Gens, und
- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementären ist.

Vorzugsweise wird unter dem Promotorbereich einer ϵ -Cyclase für die bevorzugte Pflanze *Tagetes Erecta* eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 9 oder ein Teil der selben verstanden.

Zur Herstellung der ϵ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen zur Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität werden, insbesondere für die bevorzugte Pflanze *Tagetes erecta*, besonders bevorzugt die folgenden Teil-Sequenzen verwendet:

- SEQ ID NO: 10: Sense-Fragment der 5'terminalen Region der ϵ -Cyclase
- SEQ ID NO: 11: Antisense-Fragment der 5'terminalen Region der ϵ -Cyclase
- SEQ ID NO: 12: Sense-Fragment der 3'terminalen Region der ϵ -Cyclase
- SEQ ID NO: 13: Antisense-Fragment der 3'terminalen Region der ϵ -Cyclase
- SEQ ID NO: 14: Sense-Fragment des ϵ -Cyclase-Promotors

SEQ ID NO: 15: Antisense-Fragment des ϵ -Cyclase-Promotors

In einer weiteren Ausführungsform umfasst die endogene β -Hydroxylase-dsRNA

5

a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil der Promotorsequenz eines endogenen β -Hydroxylase-Gens, und

10

b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementären ist.

Zur Herstellung der endogenen β -Hydroxylase-dsRNA-Sequenzen zur Reduzierung der endogenen β -Hydroxylase -Aktivität werden, insbesondere für die bevorzugte Pflanze *Tagetes erecta*, besonders bevorzugt die folgenden Teil-Sequenzen verwendet:

15

SEQ ID NO: 18: Sense-Fragment der 5'terminalen Region der endogenen β -Hydroxylase

20

SEQ ID NO: 19: Antisense-Fragment der 5'terminalen Region der endogenen β -Hydroxylase

25

Die dsRNA kann aus einem oder mehr Strängen von Polyribonukleotiden bestehen. Natürlich können, um den gleichen Zweck zu erreichen, auch mehrere individuelle dsRNA Moleküle, die jeweils einen der oben definierten Ribonukleotidsequenzabschnitte umfassen, in die Zelle oder den Organismus eingebracht werden.

30

Die doppelsträngige dsRNA-Struktur kann ausgehend von zwei komplementären, separaten RNA-Strängen oder - bevorzugt - ausgehend von einem einzelnen, selbstkomplementären RNA-Strang gebildet werden. In diesem Fall sind "sense"-RNA-Strang und "antisense"-RNA-Strang bevorzugt kovalent in Form eines invertierten "Repeats" miteinander verbunden.

35

Wie z.B. in WO 99/53050 beschrieben, kann die dsRNA auch eine Haarnadelstruktur umfassen, indem "sense"- und "antisense"-Strang durch eine verbindende Sequenz ("Linker"; beispielsweise ein Intron) verbunden werden. Die selbstkomplementären dsRNA-Strukturen sind bevorzugt, da sie lediglich die Expression einer RNA-Sequenz erfordern und die komplementären RNA-Stränge stets in einem äquimolaren Verhältnis umfassen. Bevorzugt ist die verbindende Sequenz ein Intron (z.B. ein Intron des

40

ST-LS1 Gens aus Kartoffel; Vancanneyt GF et al. (1990) Mol Gen Genet 220(2):245-250).

5 Die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine dsRNA kann weitere Elemente beinhalten, wie beispielsweise Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungssignale.

10 Ist die dsRNA jedoch gegen die Promotorsequenz eines Enzyms gerichtet, so umfasst sie bevorzugt keine Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungssignale. Dies ermöglicht eine Retention der dsRNA im Nukleus der Zelle und verhindert eine Verteilung der dsRNA in der gesamten Pflanze "Spreading").

Sollen die zwei Stränge der dsRNA in einer Zelle oder Pflanze zusammengebracht werden, so kann dies beispielhaft auf folgende Art geschehen:

- 15
- a) Transformation der Zelle oder Pflanze mit einem Vektor, der beide Expressionskassetten umfasst,
 - b) 20 Kotransformation der Zelle oder Pflanze mit zwei Vektoren, wobei der eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, der andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.
 - c) Kreuzung von zwei individuellen Pflanzenlinien, wobei die eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, die andere die Expressionskassetten mit dem 25 "antisense"-Strang umfasst.

Die Bildung der RNA Duplex kann entweder außerhalb der Zelle oder innerhalb derselben initiiert werden.

30 Die dsRNA kann entweder in vivo oder in vitro synthetisiert werden. Dazu kann eine DNA-Sequenz kodierend für eine dsRNA in eine Expressionskassette unter Kontrolle mindestens eines genetischen Kontrollelementes (wie beispielsweise einem Promotor) gebracht werden. Eine Polyadenylierung ist nicht erforderlich, ebenso müssen keine Elemente zur Initiierung einer Translation vorhanden sein. Bevorzugt ist die Expressionskassette für die MP-dsRNA auf dem Transformationskonstrukt oder dem Transformationsvektor enthalten.

40 Die Expressionskassetten kodierend für den "antisense"- und/oder den "sense"-Strang einer ϵ -Cyclase -dsRNA oder für den selbstkomplementären-Strang der dsRNA, werden dazu bevorzugt in einen Transformationsvektor insertiert und mit den unten

beschriebenen Verfahren in die pflanzliche Zelle eingebracht. Für das erfindungsgemäße Verfahren ist eine stabile Insertion in das Genom vorteilhaft.

5 Die dsRNA kann in einer Menge eingeführt werden, die zumindest eine Kopie pro Zelle ermöglicht. Höhere Mengen (z.B. mindestens 5, 10, 100, 500 oder 1000 Kopien pro Zelle) können ggf. eine effizienter Verminderung bewirken.

10 b) Einbringen einer antisense-Ribonukleinsäuresequenz einer ϵ -Cyclase (ϵ -Cyclase-antisenseRNA) bzw. einbringen einer antisense-Ribonukleinsäuresequenz einer endogenen β -Hydroxylase (endogene β -Hydroxylase-antisenseRNA)

15 Verfahren zur Verminderung eines bestimmten Proteins durch die "antisense"-Technologie sind vielfach - auch in Pflanzen - beschrieben (Sheehy et al. (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85: 8805-8809; US 4,801,340; Mol JN et al. (1990) FEBS Lett 268(2):427-430).

20 Das antisense Nukleinsäuremolekül hybridisiert bzw. bindet mit der zellulären mRNA und/oder genomischen DNA kodierend für die zu vermindernde ϵ -Cyclase bzw. endogene β -Hydroxylase. Dadurch wird die Transkription und/oder Translation der ϵ -Cyclase bzw. endogene β -Hydroxylase unterdrückt.

25 Die Hybridisierung kann auf konventionelle Art über die Bildung einer stabilen Duplex oder - im Fall von genomischer DNA - durch Bindung des antisense Nukleinsäuremoleküls mit der Duplex der genomischen DNA durch spezifische Wechselwirkung in der großen Furche der DNA-Helix entstehen.

30 Eine ϵ -Cyclase-antisense-RNA kann unter Verwendung der für diese ϵ -Cyclase kodierenden Nukleinsäuresequenz, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 7 nach den Basenpaarregeln von Watson und Crick abgeleitet werden. Die ϵ -Cyclase-antisenseRNA kann zu der gesamten transkribierten mRNA der ϵ -Cyclase komplementär sein, sich auf die kodierende Region beschränken oder nur aus einem Oligonukleotid bestehen, das zu einem Teil der kodierenden oder nicht-kodierenden Sequenz der mRNA komplementär ist. So kann das Oligonukleotid
35 beispielsweise komplementär zu der Region sein, die den Translationsstart für die ϵ -Cyclase umfasst.

40 Eine endogene β -Hydroxylase-antisense-RNA kann unter Verwendung der für diese endogene β -Hydroxylase kodierenden Nukleinsäuresequenz, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 16 nach den Basenpaarregeln von Watson

und Crick abgeleitet werden. Die endogene β -Hydroxylase -antisenseRNA kann zu der gesamten transkribierten mRNA der endogene β -Hydroxylase komplementär sein, sich auf die kodierende Region beschränken oder nur aus einem Oligonukleotid bestehen, das zu einem Teil der kodierenden oder nicht-kodierenden Sequenz der mRNA komplementär ist. So kann das Oligonukleotid beispielsweise komplementär zu der Region sein, die den Translationsstart für die endogene β -Hydroxylase umfasst.

Die antisenseRNAs können eine Länge von zum Beispiel 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 Nukleotide haben, kann aber auch länger sein und mindestens 100, 200, 500, 1000, 2000 oder 5000 Nukleotide umfassen. Die antisenseRNAs werden im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens bevorzugt rekombinant in der Zielzelle exprimiert.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft transgene Expressionskassetten enthaltend eine Nukleinsäuresequenz kodierend für zumindest einen Teil einer ϵ -Cyclase bzw. endogene β -Hydroxylase, wobei besagte Nukleinsäuresequenz mit einem in pflanzlichen Organismen funktionellen Promotor in antisense-Orientierung funktionell verknüpft ist.

Besagte Expressionskassetten können Teil eines Transformationskonstruktes oder Transformationsvektors sein, oder aber auch im Rahmen einer Kotransformation eingeführt werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann die Expression einer ϵ -Cyclase bzw. endogenen β -Hydroxylase durch Nukleotidsequenzen inhibiert werden, die komplementär zu der regulatorischen Region eines ϵ -Cyclase-Gens bzw. endogenen β -Hydroxylase-Gens (z.B. Promoter und/oder Enhancer) sind und triple-helikale Strukturen mit der dortigen DNA-Doppelhelix ausbilden, so dass die Transkription des ϵ -Cyclase-Gens bzw. endogenen β -Hydroxylase-Gens reduziert wird. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (Helene C (1991) Anticancer Drug Res 6(6):569-84; Helene C et al. (1992) Ann NY Acad Sci 660:27-36; Maher LJ (1992) Bioassays 14(12):807- 815).

In einer weiteren Ausführungsform kann die antisenseRNA eine α -anomere Nukleinsäure sein. Derartige α -anomere Nukleinsäuremoleküle bilden spezifische doppelsträngige Hybride mit komplementärer RNA in denen, - im Unterschied zu den konventionellen β -Nukleinsäuren - die beiden Stränge parallel zueinander verlaufen (Gautier C et al. (1987) Nucleic Acids Res 15:6625-6641).

- c) Einbringen einer ϵ -Cyclase-antisenseRNA bzw. endogene β -Hydroxylase-antisenseRNA kombiniert mit einem Ribozym

Vorteilhaft kann die oben beschriebene antisense-Strategie mit einem Ribozym-Verfahren gekoppelt werden. Katalytische RNA-Moleküle oder Ribozyme können an jede beliebige Ziel-RNA angepasst werden und spalten das Phosphodiester-Gerüst an spezifischen Positionen, wodurch die Ziel-RNA funktionell deaktiviert wird (Tanner NK (1999) FEMS Microbiol Rev 23(3):257-275). Das Ribozym wird dadurch nicht selber modifiziert, sondern ist in der Lage, weitere Ziel-RNA-Moleküle analog zu spalten, wodurch es die Eigenschaften eines Enzyms erhält. Der Einbau von Ribozymsequenzen in "antisense"-RNAs verleiht eben diesen "antisense"-RNAs diese enzymähnliche, RNA-spaltende Eigenschaft und steigert so deren Effizienz bei der Inaktivierung der Ziel-RNA. Die Herstellung und Verwendung entsprechender Ribozym-"antisense"-RNA-Moleküle ist beschrieben (u.a. bei Haselhoff et al. (1988) Nature 334: 585-591); Haselhoff und Gerlach (1988) Nature 334:585-591; Steinecke P et al. (1992) EMBO J 11(4):1525-1530; de Feyter R et al. (1996) Mol Gen Genet. 250(3):329-338).

Auf diese Art können Ribozyme (z.B. "Hammerhead"-Ribozyme; Haselhoff und Gerlach (1988) Nature 334:585-591) verwendet werden, um die mRNA eines zu vermindern- den ϵ -Cyclases katalytisch zu spalten und so die Translation zu verhindern. Die Ribozym-Technologie kann die Effizienz einer antisense-Strategie erhöhen. Verfahren zur Expression von Ribozymen zur Verminderung bestimmter Proteine sind beschrieben in (EP 0 291 533, EP 0 321 201, EP 0 360 257). In pflanzlichen Zellen ist eine Ribozym-Expression ebenfalls beschrieben (Steinecke P et al. (1992) EMBO J 11(4):1525-1530; de Feyter R et al. (1996) Mol Gen Genet. 250(3):329-338).

Geeignete Zielsequenzen und Ribozyme können zum Beispiel wie bei "Steinecke P, Ribozymes, Methods in Cell Biology 50, Galbraith et al. eds, Academic Press, Inc. (1995), S. 449-460" beschrieben, durch Sekundärstrukturberechnungen von Ribozym- und Ziel-RNA sowie durch deren Interaktion bestimmt werden (Bayley CC et al. (1992) Plant Mol Biol. 18(2):353-361; Lloyd AM and Davis RW et al. (1994) Mol Gen Genet. 242(6):653-657). Beispielsweise können Derivate der Tetrahymena L-19 IVS RNA konstruiert werden, die komplementäre Bereiche zu der mRNA des zu supprimierenden ϵ -Cyclases aufweisen (siehe auch US 4,987,071 und US 5,116,742). Alternativ können solche Ribozyme auch über einen Selektionsprozess aus einer Bibliothek diverser Ribozyme identifiziert werden (Bartel D und Szostak JW (1993) Science 261:1411-1418).

d) Einbringen einer sense-Ribonukleinsäuresequenz einer ϵ -Cyclase bzw. endogener β -Hydroxylase (ϵ -Cyclase-senseRNA bzw. endogene β -Hydroxylase-senseRNA) zur Induktion einer Kosuppression

5 Die Expression einer ϵ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz bzw. endogenen β -Hydroxylase Ribonukleinsäuresequenz (oder eines Teils derselben) in sense-Orientierung kann zu einer Kosuppression des entsprechenden ϵ -Cyclase-Gens bzw. endogenen β -Hydroxylase-Gens führen. Die Expression von sense-RNA mit Homologie zu einem endogenen Gen kann die Expression desselben vermindern oder
10 ausschalten, ähnlich wie es für antisense Ansätze beschrieben wurde (Jorgensen et al. (1996) Plant Mol Biol 31(5):957-973; Goring et al. (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:1770-1774; Smith et al. (1990) Mol Gen Genet 224:447-481; Napoli et al. (1990) Plant Cell 2:279-289; Van der Krol et al. (1990) Plant Cell 2:291-99). Dabei kann das eingeführte Konstrukt das zu vermindern, homologe Gen ganz oder nur teilweise
15 repräsentieren. Die Möglichkeit zur Translation ist nicht erforderlich. Die Anwendung dieser Technologie auf Pflanzen ist beschrieben (z.B. Napoli et al. (1990) Plant Cell 2:279-289; in US 5,034,323.

Bevorzugt wird die Kosuppression für die besonders bevorzugte Pflanze *Tagetes*
20 *erecta* unter Verwendung einer Sequenz realisiert, die im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil der Nukleinsäuresequenz kodierend für eine ϵ -Cyclase bzw. endogene β -Hydroxylase, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 7 bzw. SEQ. ID. NO. 16.

25 Bevorzugt ist die senseRNA so gewählt, dass es nicht zu einer Translation des entsprechenden Proteins oder eines Teils desselben kommen kann. Dazu kann beispielsweise der 5'-untranslatierte oder 3'-untranslatierte Bereich gewählt oder aber das ATG-Startkodon deletiert oder mutiert werden.

30 e) Einbringen von DNA-oder Protein-bindende Faktoren gegen ϵ -Cyclase Gene, -RNAs oder Proteine bzw, gegen endogene β -Hydroxylase-Gene, RNAs oder Proteine

Eine Verminderung einer ϵ -Cyclase bzw. endogene β -Hydroxylase Expression ist
35 auch mit spezifischen DNA-bindenden Faktoren z.B. mit Faktoren vom Typ der Zinkfingertranskriptionsfaktoren möglich. Diese Faktoren lagern sich an die genomische Sequenz des endogenen Zielgens, bevorzugt in den regulatorischen Bereichen, an und bewirken eine Verminderung der Expression. Entsprechende Verfahren zur Herstellung entsprechender Faktoren sind beschrieben (Dreier B et al. (2001) J Biol
40 Chem 276(31):29466-78; Dreier B et al. (2000) J Mol Biol 303(4):489-502; Beerli RR

- et al. (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (4):1495-1500; Beerli RR et al. (2000) *J Biol Chem* 275(42):32617-32627; Segal DJ and Barbas CF 3rd. (2000) *Curr Opin Chem Biol* 4(1):34-39; Kang JS and Kim JS (2000) *J Biol Chem* 275(12):8742-8748; Beerli RR et al. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95(25):14628-14633; Kim JS et al. (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* 94(8):3616-3620; Klug A (1999) *J Mol Biol* 293(2):215-218; Tsai SY et al. (1998) *Adv Drug Deliv Rev* 30(1-3):23-31; Mapp AK et al. (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97(8):3930-3935; Sharrocks AD et al. (1997) *Int J Biochem Cell Biol* 29(12):1371-1387; Zhang L et al. (2000) *J Biol Chem* 275(43):33850-33860).
- 10 Die Selektion dieser Faktoren kann unter Verwendung eines beliebigen Stückes eines ϵ -Cyclase-Gens bzw. endogenen β -Hydroxylase-Gens erfolgen. Bevorzugt liegt dieser Abschnitt im Bereich der Promotorregion. Für eine Genunterdrückung kann er aber auch im Bereich der kodierenden Exons oder Introns liegen.
- 15 Ferner können Faktoren in eine Zelle eingebracht werden, die die ϵ -Cyclase bzw. endogene β -Hydroxylase selber inhibieren. Diese proteinbindenden Faktoren können z.B. Aptamere (Famulok M und Mayer G (1999) *Curr Top Microbiol Immunol* 243:123-36) oder Antikörper bzw. Antikörperfragmente oder einzelkettige Antikörper sein. Die Gewinnung dieser Faktoren ist beschrieben (Owen M et al. (1992) *Biotechnology* (N Y) 10(7):790-794; Franken E et al. (1997) *Curr Opin Biotechnol* 8(4):411-416; Whitelam (1996) *Trend Plant Sci* 1:286-272).
- 20 (N Y) 10(7):790-794; Franken E et al. (1997) *Curr Opin Biotechnol* 8(4):411-416; Whitelam (1996) *Trend Plant Sci* 1:286-272).
- f) Einbringen von den ϵ -Cyclase RNA-Abbau bzw. endogenen β -Hydroxylase RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenzen und Expressions-
- 25 konstrukt
- Die ϵ -Cyclase bzw. endogene β -Hydroxylase Expression kann effektiv auch durch Induktion des spezifischen RNA-Abbaus durch die Pflanze mit Hilfe eines viralen Expressionssystems (Amplikon; Angell SM et al. (1999) *Plant J* 20(3):357-362) realisiert werden. Diese Systeme - auch als "VIGS" (viral induced gene silencing) bezeichnet - bringen Nukleinsäuresequenzen mit Homologie zu dem Transkript einer zu reduzierenden Enzymaktivität mittels viraler Vektoren in die Pflanze ein.
- 30 Die Transkription wird sodann - vermutlich mediert durch pflanzliche Abwehrmechanismen gegen Viren - abgeschaltet. Entsprechende Techniken und Verfahren sind beschrieben (Ratcliff F et al. (2001) *Plant J* 25(2):237-45; Fagard M und Vaucheret H (2000) *Plant Mol Biol* 43(2-3):285-93; Anandalakshmi R et al. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95(22):13079-84; Ruiz MT (1998) *Plant Cell* 10(6):937-46).
- 35

Bevorzugt wird die VIGS-vermittelte Verminderung unter Verwendung einer Sequenz realisiert, die im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil der Nukleinsäuresequenz kodierend für eine ϵ -Cyclase bzw. eine endogene β -Hydroxylase, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 7 bzw. 16.

5

g) Einbringen von Konstrukten zur Erzeugung eines Funktionsverlustes oder einer Funktionsminderung an ϵ -Cyclase-Genen bzw. endogenen β -Hydroxylase-Genen

- 10 Dem Fachmann sind zahlreiche Verfahren bekannt, wie genomische Sequenzen gezielt modifiziert werden können. Dazu zählen insbesondere Verfahren wie die Erzeugung von Knockout-Mutanten mittels gezielter homologen Rekombination z.B. durch Generierung von Stopp-Kodons, Verschiebungen im Leseraster etc. (Hohn B und Puchta H (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96:8321-8323) oder die gezielte Deletion
15 oder Inversion von Sequenzen mittels z.B. sequenzspezifischer Rekombinasen oder Nukleasen (s.u.).

- Die Verminderung der Enzym-Menge, -Funktion und/oder -Aktivität kann auch durch eine gezielte Insertion von Nukleinsäuresequenzen (z.B. der im Rahmen der erfindungsgemäßen Verfahrens zu insertierenden Nukleinsäuresequenz) in die Sequenz
20 kodierend für eine ϵ -Cyclase bzw. endogene β -Hydroxylase (z.B. mittels intermolekularer homologer Rekombination) realisiert werden. Im Rahmen dieser Ausführungsform verwendet man bevorzugt ein DNA-Konstrukt, das zumindest einen Teil der Sequenz eines ϵ -Cyclasegens bzw. endogenen β -Hydroxylasegens oder benachbarter Sequenzen umfasst, und so mit diesen in der Zielzelle gezielt rekombinieren
25 kann, so dass durch eine Deletion, Addition oder Substitution mindestens eines Nukleotids das ϵ -Cyclase-Gen bzw. endogene β -Hydroxylase-Gen so verändert wird, dass die Funktionalität des Gens reduziert oder gänzlich aufgehoben wird.

- 30 Die Veränderung kann auch die regulativen Elemente (z.B. den Promotor) der Gene betreffen, so dass die kodierende Sequenz unverändert bleibt, eine Expression (Transkription und/oder Translation) jedoch unterbleibt und reduziert wird. Bei der konventionellen homologen Rekombination ist die zu insertierende Sequenz an ihrem 5'- und/oder 3'-Ende von weiteren Nukleinsäuresequenzen (A' bzw. B') flankiert,
35 die eine ausreichende Länge und Homologie zu entsprechenden Sequenzen des ϵ -Cyclase-Gens bzw. endogenen β -Hydroxylase-Gens (A bzw. B) für die Ermöglichung der homologen Rekombination aufweisen. Die Länge liegt in der Regel in einem Bereich von mehreren hundert Basen bis zu mehreren Kilobasen (Thomas KR und Capecchi MR (1987) Cell 51:503; Strepp et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA
40 95(8):4368-4373). Für die homologe Rekombination wird die pflanzliche Zelle mit dem

Rekombinationskonstrukt unter Verwendung der unten beschriebenen Verfahren transformiert und erfolgreich rekombinierte Klone basierend auf der infolge inaktivierten ϵ -Cyclase bzw. endogenen β -Hydroxylase selektioniert.

- 5 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Effizienz der Rekombination gesteigert durch Kombination mit Verfahren, die die homologe Rekombination fördern. Solche Verfahren sind beschrieben und umfassen beispielhaft die Expression von Proteinen wie RecA oder die Behandlung mit PARP-Inhibitoren. Es konnte gezeigt werden, dass die intrachromosomale homologe Rekombination in Tabakpflanzen durch
10 die Verwendung von PARP-Inhibitoren erhöht werden kann (Puchta H et al. (1995) Plant J 7:203-210). Durch den Einsatz dieser Inhibitoren kann die Rate der homologen Rekombination in den Rekombinationskonstrukten nach Induktion des sequenzspezifischen DNA-Doppelstrangbruchs und damit die Effizienz der Deletion der Transgen-sequenzen weiter erhöht werden. Verschiedene PARP Inhibitoren können dabei
15 zum Einsatz kommen. Bevorzugt umfasst sind Inhibitoren wie 3-Aminobenzamid, 8-Hydroxy-2-methylquinazolin-4-on (NU1025), 1,11b-Dihydro-[2H]benzopyrano-[4,3,2-de]isoquinolin-3-on (GPI 6150), 5-Aminoisoquinolinon, 3,4-Dihydro-5-[4-(1-piperidinyloxy)]-1(2H)-isoquinolinon oder die in WO 00/26192, WO 00/29384, WO 00/32579, WO 00/64878, WO 00/68206, WO 00/67734, WO 01/23386 und
20 WO 01/23390 beschriebenen Substanzen.

- Weitere geeignete Methoden sind die Einführung von Nonsense-Mutationen in endogene Markerprotein Gene zum Beispiel mittels Einführung von RNA/DNA-Oligonukleotiden in die Pflanze (Zhu et al. (2000) Nat Biotechnol 18(5):555-558) oder
25 die Generierung von Knockout-Mutanten mit Hilfe von z.B. T-DNA-Mutagenese (Koncz et al., Plant Mol. Biol. 1992, 20(5):963-976). Punktmutationen können auch mittels DNA-RNA Hybriden erzeugt werden, die auch als "chimeraplasty" bekannt sind (Cole-Strauss et al. (1999) Nucl Acids Res 27(5):1323-1330; Kmiec (1999) Gene therapy American Scientist 87(3):240-247).

- 30 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch:

- a) Einbringen mindestens einer doppelsträngigen ϵ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen und/oder
35 b) Einbringen mindestens einer ϵ -Cyclase antisense-Ribonukleinsäuresequenzen oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette in Pflanzen.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch Einbringen mindestens einer doppelsträngigen ϵ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen.

5

Vorzugsweise erfolgt die Transkription der ϵ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen im erfindungsgemäßen Verfahren unter Kontrolle von Regulationssignalen, vorzugsweise einem Promotor und plastidären Transitpeptiden, die die Transkription der ϵ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen in den Pflanzengewebe, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, gewährleisten.

10

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform verwendet man genetisch veränderte Pflanzen, die in Pflanzengewebe, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, die höchste Transkriptionsrate der ϵ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen aufweisen.

15

Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, dass die Transkription der ϵ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen unter Kontrolle eines für das Pflanzengewebe spezifischen Promotors erfolgt.

20

Für den vorstehend beschriebenen Fall, dass die Expression in Blüten erfolgen soll ist es vorteilhaft, dass die Transkription der ϵ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen unter Kontrolle eines blütenspezifischen oder bevorzugter petalenspezifischen Promotors erfolgt.

25

Für den vorstehend beschriebenen Fall, dass die Expression in Früchten erfolgen soll ist es vorteilhaft, dass die Transkription der ϵ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen unter Kontrolle eines fruchtspezifischen Promotors erfolgt.

30

Für den vorstehend beschriebenen Fall, dass die Expression in Knollen erfolgen soll ist es vorteilhaft, dass die Transkription der ϵ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen unter Kontrolle eines knollenspezifischen Promotors erfolgt.

35

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Reduzierung der endogenen β -Hydroxylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch:

- a) Einbringen mindestens einer doppelsträngigen endogenen β -Hydroxylase Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen und/oder

- b) Einbringen mindestens einer endogenen β -Hydroxylase antisense-Ribonukleinsäuresequenzen oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette in Pflanzen.

5 In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Reduzierung der endogenen β -Hydroxylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch Einbringen mindestens einer doppelsträngigen endogenen β -Hydroxylase Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen.

10

Vorzugsweise erfolgt die Transkription der endogenen β -Hydroxylase-dsRNA-Sequenzen im erfindungsgemäßen Verfahren unter Kontrolle von Regulationssignalen, vorzugsweise einem Promotor und plastidären Transitpeptiden, die die Transkription der endogenen β -Hydroxylase-dsRNA-Sequenzen in den Pflanzengeweben, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, gewährleisten.

15

20

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform verwendet man genetisch veränderte Pflanzen, die in Pflanzengeweben, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, die höchste Transkriptionsrate der endogenen β -Hydroxylase-dsRNA-Sequenzen aufweisen.

25

Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, dass die Transkription der endogenen β -Hydroxylase-dsRNA-Sequenzen unter Kontrolle eines für das Pflanzengewebe spezifischen Promotors erfolgt.

30

Für den vorstehend beschriebenen Fall, dass die Expression in Blüten erfolgen soll ist es vorteilhaft, dass die Transkription der endogenen β -Hydroxylase-dsRNA-Sequenzen unter Kontrolle eines blütenspezifischen oder bevorzugter petalenspezifischen Promotors erfolgt.

35

Für den vorstehend beschriebenen Fall, dass die Expression in Früchten erfolgen soll ist es vorteilhaft, dass die Transkription der endogenen β -Hydroxylase-dsRNA-Sequenzen unter Kontrolle eines fruchtspezifischen Promotors erfolgt.

40

Für den vorstehend beschriebenen Fall, dass die Expression in Knollen erfolgen soll ist es vorteilhaft, dass die Transkription der endogenen β -Hydroxylase-dsRNA-Sequenzen unter Kontrolle eines knollenspezifischen Promotors erfolgt.

Besonders bevorzugt werden im erfindungsgemäßen Verfahren genetisch veränderte Pflanzen mit folgende Kombinationen genetischer Veränderungen verwendet:

Genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte, erfindungsgemäße β -Cyclase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

- 5 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte, erfindungsgemäße β -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte ϵ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

- genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte, erfindungsgemäße β -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte, endogene β -Hydroxylase-Aktivität aufweisen,
- 10

- genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte, erfindungsgemäße β -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine reduzierte ϵ -Cyclase-Aktivität aufweisen.
- 15

- genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte, erfindungsgemäße β -Cyclase-Aktivität, eine reduzierte ϵ -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte, endogene β -Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

- 20 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte, erfindungsgemäße β -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine reduzierte, endogene β -Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

- genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte, erfindungsgemäße β -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine reduzierte ϵ -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte, endogene β -Hydroxylase-Aktivität aufweisen.
- 25

- Die Herstellung dieser genetisch veränderten Pflanzen kann, wie nachstehend beschrieben, beispielsweise durch Einbringen einzelner Nukleinsäurekonstrukte (Expressionskassetten) oder durch Einbringen von Mehrfachkonstrukten erfolgen, die bis zu zwei, drei oder vier der beschriebenen Aktivitäten enthalten.
- 30

- Im erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von β -Carotinoiden wird vorzugsweise dem Kultivierungsschritt der genetisch veränderten Pflanzen, im folgenden auch transgene Pflanzen bezeichnet, ein Ernten der Pflanzen und die Isolierung der β -Carotinoide aus den Pflanzen oder den Pflanzengeweben, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, angeschlossen.
- 35

- Die transgenen Pflanzen werden in an sich bekannter Weise auf Nährböden gezogen und entsprechend geerntet.
- 40

Die Isolierung von β -Carotinoiden aus den geernteten Pflanzengewebe, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, wie beispielsweise Blüten, Früchten oder Knollen erfolgt in an sich bekannter Weise, beispielsweise durch Trocknung und anschließender Extraktion und gegebenenfalls weiterer chemischer oder physikalischer Reinigungsprozesse, wie beispielsweise Fällungsmethoden, Kristallographie, thermische Trennverfahren, wie Rektifizierverfahren oder physikalische Trennverfahren, wie beispielsweise Chromatographie. Die Isolierung von β -Carotinoiden aus den Pflanzengewebe, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, wie beispielsweise Blüten, Früchten oder Knollen erfolgt beispielsweise bevorzugt durch organische Lösungsmittel wie Aceton, Hexan, Ether oder tert.-Methylbutylether.

Weitere Isolierverfahren von β -Carotinoiden, insbesondere aus Blütenblättern, sind beispielsweise in Egger und Kleinig (Phytochemistry (1967) 6, 437-440) und Egger (Phytochemistry (1965) 4, 609-618) beschrieben.

Vorzugsweise sind die β -Carotinoide ausgewählt aus der Gruppe β -Carotin, β -Cryptoxanthin, Zeaxanthin, Antheraxanthin, Violaxanthin und Neoxanthin.

Bevorzugte β -Carotinoide sind β -Carotin und Zeaxanthin, besonders bevorzugt Zeaxanthin.

Vorzugsweise sind die Pflanzengewebe, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, ausgewählt aus der Gruppe Blüte, Frucht und Knolle.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man als genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität in Blüten aufweist, eine Pflanze, ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassiceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Illiaceae oder Lamiaceae.

Besonders bevorzugt sind Pflanzen, ausgewählt aus den Pflanzengattungen Marigold, Tagetes erecta, Tagetes patula, Acacia, Aconitum, Adonis, Arnica, Aquilegia, Aster, Astragalus, Bignonia, Calendula, Calendula officinalis, Caltha, Campanula, Canna, Centaurea, Cheiranthus, Chrysanthemum, Citrus, Crepis, Crocus, Curcubita, Cytisus, Delonia, Delphinium, Dianthus, Dimorphotheca, Doronicum, Eschscholtzia, Forsythia, Fremontia, Gazania, Gelsemium, Genista, Gentiana, Geranium, Gerbera, Geum,

- Grevillea, Helenium, Helianthus, Hepatica, Heracleum, Hisbiscus, Heliopsis, Hypericum, Hypochoeris, Impatiens, Iris, Jacaranda, Kerria, Laburnum, Lathyrus, Leontodon, Lilium, Linum, Lotus, Lycopersicon, Lysimachia, Maratia, Medicago, Mimulus, Narcissus, Oenothera, Osmanthus, Petunia, Photinia, Physalis, Phyteuma, Potentilla,
- 5 Pyracantha, Ranunculus, Rhododendron, Rosa, Rudbeckia, Senecio, Silene, Silphium, Sinapsis, Solanum tuberosum, Sorbus, Spartium, Tecoma, Torenia, Tragopogon, Trollius, Tropaeolum, Tulipa, Tussilago, Ulex, Viola oder Zinnia.

- In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens
- 10 verwendet man als genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität in Früchten aufweisen, eine Pflanze ausgewählt aus den Pflanzengattungen Actinophloeus, Aglaeonema, Ananas, Arbutus, Archontophoenix, Area, Aronia, Asparagus, Avocado, Attalea, Berberis, Bixia, Brachychilum, Bryonia, Caliptocalix, Capsicum, Carica, Celastrus, Citrullus, Citrus, Convallaria, Cotoneaster,
- 15 Crataegus, Cucumis, Cucurbita, Cuscuta, Cycas, Cyphomandra, Dioscorea, Diospyrus, Dura, Elaeagnus, Elaeis, Erythroxylon, Euonymus, Erbse, Ficus, Fortunella, Fragaria, Gardinia, Gonocaryum, Gossypium, Guava, Guilielma, Hibiscus, Hippophaea, Iris, Kiwi, Lathyrus, Lonicera, Luffa, Lycium, Lycopersicum, Mais, Malpighia, Mangifera, Mormodica, Murraya, Musa, Nenga, Orange, Palisota, Pandanus, Passiflora, Persea,
- 20 Physalis, Prunus, Ptychandra, Punica, Pyracantha, Pyrus, Ribes, Rosa, Rubus, Sabal, Sambucus, Seaforita, Shepherdia, Solanum, Sorbus, Synaspadix, Tabernae, Tamus, Taxus, Trichosanthes, Triphasia, Vaccinium, Viburnum, Vignia, Vitis oder Zucchini verwendet.

- 25 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man als genetisch veränderte Pflanze, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität in Knollen aufweist, eine Pflanze ausgewählt aus den Pflanzengattungen Rote Beete, Radieschen, Rettich und Solanum tuberosum.

- 30 Besonders bevorzugte Pflanzen weisen als Wildtyp am Gesamtcarotinoidgehalt in Pflanzengewebe, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide einen höheren Anteil an α -Carotinoiden als β -Carotinoiden auf.

- Besonders bevorzugte Pflanzen sind Marigold, Tagetes erecta, Tagetes patula wobei
- 35 die Herstellung der β -Carotinoide, vorzugsweise Zeaxanthin, in Blüten, besonders bevorzugt in den Petalen stattfindet.

- Im folgenden wird exemplarisch die Herstellung genetisch veränderter Pflanzen mit erhöhter β -Cyclase-Aktivität in Pflanzengewebe, enthaltend photosynthetisch inaktive
- 40 Plastide, wie beispielsweise Blüten, Früchten oder Knollen beschrieben. Die Erhöhung

weiterer Aktivitäten, wie beispielsweise der Hydroxylase-Aktivität kann analog unter Verwendung von Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Hydroxylase anstelle von Nukleinsäuresequenzen kodierend eine β -Cyclase erfolgen. Die Reduzierung weiterer Aktivitäten, wie beispielsweise die Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität und/oder der endogenen β -Hydroxylase-Aktivität kann analog unter Verwendung von antisense-Nukleinsäuresequenzen oder Inverted-Repeat-Nukleinsäuresequenz anstelle von Nukleinsäuresequenzen kodierend eine β -Cyclase erfolgen.

Die Transformation kann bei den Kombinationen von genetischen Veränderungen einzeln oder durch Mehrfachkonstrukte erfolgen.

Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgt vorzugsweise durch Transformation der Ausgangspflanzen, mit einem Nukleinsäurekonstrukt, das die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren codierend eine β -Cyclase enthält, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.

Diese Nukleinsäurekonstrukte, in denen die kodierende Nukleinsäuresequenz mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten, werden im folgenden auch Expressionskassetten genannt.

Die Erfindung betrifft weiterhin Nukleinsäurekonstrukte enthaltend mindestens eine Nukleinsäure kodierend eine β -Cyclase und zusätzlich mindestens eine weitere Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe

- a) Nukleinsäuren kodierend eine β -Hydroxylase,
- b) doppelsträngige endogenen β -Hydroxylase Ribonukleinsäuresequenz und/oder endogene β -Hydroxylase antisense-Ribonukleinsäuresequenzen und
- c) doppelsträngige ϵ -Cyclase- Ribonukleinsäuresequenz und/oder ϵ -Cyclase antisense-Ribonukleinsäuresequenz,

wobei die Nukleinsäuren mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.

Es ist, insbesondere in Pflanzen, technisch nur schwer zu realisieren, mehrere Aktivitäten mit einem Nukleinsäurekonstrukt zu erhöhen oder zu erniedrigen. Daher werden bevorzugt Kombinationen von Nukleinsäurekonstrukten verwendet um die Aktivitäten, insbesondere um mehr als 3 Aktivitäten in Pflanzen zu erhöhen oder zu erniedrigen.

Es ist jedoch auch möglich, genetisch veränderte Pflanzen zu kreuzen, die bereits veränderte Aktivitäten enthalten. Beispielsweise ist es durch Kreuzen von genetisch veränderten Pflanzen, die jeweils zwei veränderte Aktivitäten enthalten, möglich, Pflanzen mit vier veränderten Aktivitäten herzustellen. Gleiches kann auch erreicht werden, indem man eine Kombination von zwei Nukleinsäurekonstrukten die jeweils 2 Aktivitäten verändern in die Pflanzen einführt.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die bevorzugten genetisch veränderten Pflanzen durch Einbringen von Kombinationen von Nukleinsäurekonstrukten hergestellt.

Vorzugsweise enthalten die Regulationssignale einen oder mehrere Promotoren, die die Transkription und Translation in Pflanzengeweben, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, wie beispielsweise Blüten, Früchten oder Knollen, gewährleisten.

Die Expressionskassetten beinhalten Regulationssignale, also regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfasst eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für mindestens eines der vorstehend beschriebenen Gene operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, das jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

Im folgenden werden beispielhaft die bevorzugten Nukleinsäurekonstrukte, Expressionskassetten und Vektoren für Pflanzen und Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen, sowie die transgenen Pflanzen selbst beschrieben.

Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).

Als erfindungsgemäßer Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzengeweben, ent-

haltend photosynthetisch inaktive Plastide, wie beispielsweise Blüte, Frucht oder Knolle steuern kann.

- 5 "Konstitutiver" Promotor meint solche Promotoren, die eine Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten.

Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der
10 Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294; Odell et al. (1985) Nature 313:810-812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140:281-288; Gardner et al. (1986) Plant Mol Biol 6:221-228) oder der 19S CaMV Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202).

15 Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor ist der pds Promoter (Pecker et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci USA 89: 4962-4966) oder der "Rubisco small subunit (SSU)"-Promotor (US 4,962,028), der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-Nr. X03677), der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobacterium, der TR-Doppel-
20 promotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) Plant Mol Biol 29:637-649), den Ubiquitin-1 Promotor (Christensen et al. (1992) Plant Mol Biol 18:675-689; Bruce et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:9692-9696), den Smas Promotor, den Cinnamylalkoholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der vakuolärer ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991),
25 der Pnit-Promoter (Y07648.L, Hillebrand et al. (1998), Plant. Mol. Biol. 36, 89-99, Hillebrand et al. (1996), Gene, 170, 197-200, der Ferredoxin-NADPH-Oxidoreductase Promotor (Datenbankeintrag AB011474, Position 70127 bis 69493), der TPT-Promoter (WO 03006660), der „Superpromotor“ (US-Patent 5955646), der 34S-Promotor (US-
30 Patent 6051753) sowie weitere Promotoren von Genen, deren konstitutive Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist.

Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol
35 Biol 48:89-108), durch den die Expression des β -Cyclase-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer Promotor (EP 0 388 186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor
40 (Gatz et al. (1992) Plant J 2:397-404), ein durch Abscisinsäure induzierbarer Promotor

(EP 0 335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer Promotor (WO 93/21334) können ebenfalls verwendet werden.

- Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden wie beispielsweise der pathogen-induzierbare Promotor des PRP1-Gens (Ward et al. (1993) *Plant Mol Biol* 22:361-366), der hitzeinduzierbare hsp70- oder hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare alpha-Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814), der licht-induzierbare PPDK Promotor oder der verwundungsinduzierte pinII-Promoter (EP375091).
- Pathogen-induzierbare Promotoren umfassen die von Genen, die infolge eines Pathogenbefalls induziert werden wie beispielsweise Gene von PR-Proteinen, SAR-Proteinen, β -1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) *Neth J Plant Pathol* 89:245-254; Uknes, et al. (1992) *The Plant Cell* 4:645-656; Van Loon (1985) *Plant Mol Biol* 4:111-116; Marineau et al. (1987) *Plant Mol Biol* 9:335-342; Matton et al. (1987) *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2:325-342; Somssich et al. (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) *Mol Gen Genetics* 2:93-98; Chen et al. (1996) *Plant J* 10:955-966; Zhang and Sing (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91:2507-2511; Warner, et al. (1993) *Plant J* 3:191-201; Siebertz et al. (1989) *Plant Cell* 1:961-968(1989).
- Umfasst sind auch verwundungs-induzierbare Promotoren wie der des pinII Gens (Ryan (1990) *Ann Rev Phytopath* 28:425-449; Duan et al. (1996) *Nat Biotech* 14:494-498), des wun1 und wun2-Gens (US 5,428,148), des win1- und win2-Gens (Stanford et al. (1989) *Mol Gen Genet* 215:200-208), des Systemin (McGurl et al. (1992) *Science* 225:1570-1573), des WIP1-Gens (Rohmeier et al. (1993) *Plant Mol Biol* 22:783-792; Ekelkamp et al. (1993) *FEBS Letters* 323:73-76), des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) *The Plant J* 6(2):141-150) und dergleichen.
- Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise fruchtreifung-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtreifung-spezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794, EP 409 625). Entwicklungsabhängige Promotoren schließt zum Teil die gewebespezifischen Promotoren ein, da die Ausbildung einzelner Gewebe naturgemäß entwicklungsabhängig erfolgt.
- Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzengeweben sicherstellen, in denen beispielsweise die Biosynthese von β -XCarotinoiden bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Bevorzugt sind beispielsweise Promotoren mit Spezifitäten für die Antheren, Ovarien, Petalen, Sepalen, Blüten, Blätter, Stengel und Wurzeln und Kombinationen hieraus.

Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren sind beispielsweise der Patatin Promotor Klasse I (B33) oder der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel.

5

Blütenspezifische Promotoren sind beispielsweise der Phytoen Synthase Promotor (WO 92/16635), der Promotor des P-rr Gens (WO 98/22593), der EPSPS-Promotor (M37029), der DFR-A Promotor (X79723), der B-Gen Promotor (WO 0008920) und der CHRC-Promotor (WO 98/24300; Vishnevetsky et al. (1996) Plant J. 10, 1111-1118),
10 der Promotor P76 und P84 (DE Patentanmeldung 10247599.7) sowie die Promotoren der Arabidopsis Gen-Loci At5g33370 (infolge M1 Promoter), At5g22430 (infolge M2 Promoter) und At1g26630 (infolge M3 Promoter).

15

Weitere zur Expression in Pflanzen geeignete Promotoren sind beschrieben in Rogers et al. (1987) Methods in Enzymol 153:253-277; Schardl et al. (1987) Gene 61:1-11 und Berger et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:8402-8406).

20

Alle in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen Promotoren ermöglichen die Expression der β -Cyclase in in Pflanzengewebe, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, wie beispielsweise Blüte, Frucht oder Knolle.

25

Bevorzugte Promotoren sind Promotoren die spezifisch für Pflanzengewebe, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide sind.

30

Besonders bevorzugt im erfindungsgemäßen Verfahren sind, wie vorstehend erwähnt, je nach verwendeter Pflanze konstitutive, blütenspezifische und insbesondere blütenblattspezifische, fruchtspezifische und knollenspezifische Promotoren.

35

Die vorliegende Erfindung betrifft daher insbesondere ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen blütenspezifischen oder insbesondere einen blütenblattspezifischen Promotor und eine Nukleinsäure codierend eine β -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz
40 SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

40

Die vorliegende Erfindung betrifft daher insbesondere ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen fruchtspezifischen Promotor und eine Nukleinsäure codierend eine β -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Amino-

säuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, mit der Maßgabe dass der natürliche Promotor der β -Cyclase ausgenommen ist.

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft daher insbesondere ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen knollenspezifischen Promotor und eine Nukleinsäure codierend eine β -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, mit der Maßgabe dass der natürliche Promotor der β -Cyclase ausgenommen ist.
- 10

- Die vorliegende Erfindung betrifft daher insbesondere ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen konstitutiven Promotor und eine Nukleinsäure codierend eine β -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, mit der Maßgabe dass der natürliche Promotor der β -Cyclase ausgenommen ist.
- 15

- 20 Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt vorzugsweise durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer vorstehend beschriebenen Nukleinsäure codierend eine β -Cyclase und vorzugsweise einer zwischen Promotor und Nukleinsäure-Sequenz inserierten Nukleinsäure, die für ein plastidenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.
- 25
- 30

- Die vorzugsweise insertierte Nukleinsäuren codierend ein plastidäres Transitpeptid, gewährleisten die Lokalisation in Plastiden und insbesondere in Chromoplasten.
- 35

Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren Nukleinsäure-Sequenz für ein β -Cyclase-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chromoplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation der

β -Cyclase in die Chromoplasten vom β -Cyclase-Teil enzymatisch abgespalten werden.

Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären *Nicotiana tabacum* Transketolase oder einem anderen Transitpeptid (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco (*rbcS*) oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase als auch der Isopentenylpyrophosphat Isomerase-2) oder dessen funktionellem Äquivalent abgeleitet ist.

Besonders bevorzugt sind Nukleinsäure-Sequenzen von drei Kassetten des Plastiden-Transitpeptids der plastidären Transketolase aus Tabak in drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragmente mit einem ATG-Codon in der NcoI Schnittstelle:

pTP09

15

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTC
GTTCTGTCCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCTTCTTCTCT-
CACTTTTTCGGGCCTTAAATCCAATCCCAATATCACCACTCCCGCCGCCG-
TACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCGTAAGGTCACCGGC-
20 GATTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGCCTG-
GATCC_BamHI

pTP10

25

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTC
GTTCTGTCCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCTTCTTCTCT-
CACTTTTTCGGGCCTTAAATCCAATCCCAATATCACCACTCCCGCCGCCG-
TACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCGTAAGGTCACCGGC-
GATTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGCCTG-
30 GATCC_BamHI

pTP11

35

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTC
GTTCTGTCCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCTTCTTCTCT-
CACTTTTTCGGGCCTTAAATCCAATCCCAATATCACCACTCCCGCCGCCG-
TACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCGTAAGGTCACCGGC-
GATTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGCCTG-
40 GATCC_BamHI

Weitere Beispiele für ein plastidäres Transitpeptid sind das Transitpeptid der plastidären Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) aus *Arabidopsis thaliana* und das Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Ribulosebisphosphat Carboxylase (rbcS) aus Erbse (Guerineau, F, Woolston, S, Brooks, L, Mullineaux, P (1988) An expression cassette for targeting foreign proteins into the chloroplasts. Nucl. Acids Res. 16: 11380).

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen Nukleinsäure-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen.

Bevorzugt sind, wie vorstehend beschrieben, synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden.

Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet vorzugsweise in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine kodierende Nukleinsäuresequenz oder ein Nukleinsäurekonstrukt und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

Beispiele für einen Terminator sind der 35S-Terminator (Guerineau et al. (1988) Nucl Acids Res. 16: 11380), der nos Terminator (Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. J Mol Appl Genet. 1982;1(6):561-73) oder der ocs Terminator (Gielen, J, de Beuckeleer, M, Seurinck, J, Debroek, H, de Greve, H, Lemmers, M, van Montagu,

M, Schell, J (1984) The complete sequence of the TL-DNA of the *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiAch5. EMBO J. 3: 835-846).

- 5 Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primer-repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden.
- 10 Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation-zur Verfügung gestellt werden.
- 15 Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.
- 20 Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet.
- 25 Dazu können an sich bekannte Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt werden.
- 30 Geeignete Methoden zur Transformation von Pflanzen sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone – die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der, vorstehend beschriebene, durch *Agrobacterium* vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-143 sowie in
- 35 Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225) beschrieben.

Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19

(Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711) oder besonders bevorzugt pSUN2, pSUN3, pSUN4 oder pSUN5 (WO 02/00900).

5 Mit einem Expressionsplasmid transformierte Agrobakterien können in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

10 Zur bevorzugten Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, im folgenden auch transgene Pflanzen bezeichnet, wird die fusionierte Expressionskassette, die eine β -Cyclase exprimiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19 oder insbesondere pSUN5 kloniert, der geeignet ist, in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert zu werden. Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen
15 verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

20 Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die Expressionskassette integriertes Gen für die Expression einer Nukleinsäure
25 codierend eine β -Cyclase enthalten.

30 Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine β -Cyclase kodierenden Nukleinsäure wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71-119 (1993) beschrieben.

35 Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pJIT117 (Guerineau et al. (1988) Nucl. Acids Res. 16 :11380), pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.

Die Erfindung betrifft ferner die genetisch veränderten Pflanzen, wobei die genetische Veränderung die Aktivität einer β -Cyclase in Pflanzengeweben, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, gegenüber dem Wildtyp erhöht und die erhöhte β -Cyclase-Aktivität durch eine β -Cyclase verursacht wird, enthaltend die Aminosäuresequenz

5 SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

Vorzugsweise erfolgt die Erhöhung der β -Cyclase-Aktivität durch eine Erhöhung der

10 Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, gegenüber dem Wildtyp.

15 Vorzugsweise erfolgt die Erhöhung der Genexpression dadurch, dass man Nukleinsäuren in die Pflanze einbringt, die β -Cyclasen kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens

20 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

Bevorzugt sind genetisch veränderte Pflanze, die mindestens eine Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder

25 eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, enthalten, mit der Maßgabe, dass Tomate ausgenommen ist.

Weiter besonders bevorzugte, genetisch veränderte Pflanzen weisen, wie vorstehend

30 erwähnt, zusätzlich gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität auf. Weiter bevorzugte Ausführungsformen sind vorstehend im erfindungsgemäßen Verfahren beschrieben.

Weiter besonders bevorzugte, genetisch veränderte Pflanzen weisen, wie vorstehend

35 erwähnt, zusätzlich gegenüber dem Wildtyp eine reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe ϵ -Cyclase-Aktivität und endogene β -Hydroxylase-Aktivität auf. Weiter bevorzugte Ausführungsformen sind vorstehend im erfindungsgemäßen Verfahren beschrieben.

Vorzugsweise sind die Pflanzengewebe, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, ausgewählt sind aus der Gruppe Blüte, Frucht und Knolle.

- In einer bevorzugten Ausführungsform sind die genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität in Blüten aufweisen ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassiceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Illiaceae oder Lamiaceae.

- Besonders bevorzugt sind Pflanzen, ausgewählt aus den Pflanzengattungen Marigold, Tagetes erecta, Tagetes patula, Acacia, Aconitum, Adonis, Arnica, Aquilegia, Aster, Astragalus, Bignonia, Calendula, Calendula officinalis, Caltha, Campanula, Canna, Centaurea, Cheiranthus, Chrysanthemum, Citrus, Crepis, Crocus, Curcubita, Cytisus, Delonia, Delphinium, Dianthus, Dimorphotheca, Doronicum, Eschscholtzia, Forsythia, Fremontia, Gazania, Gelsemium, Genista, Gentiana, Geranium, Gerbera, Geum, Grevillea, Helenium, Helianthus, Hepatica, Heracleum, Hibiscus, Heliopsis, Hypericum, Hypochoeris, Impatiens, Iris, Jacaranda, Kerria, Laburnum, Lathyrus, Leontodon, Lilium, Linum, Lotus, Lycopersicon, Lysimachia, Maratia, Medicago, Mimulus, Narcissus, Oenothera, Osmanthus, Petunia, Photinia, Physalis, Phyteuma, Potentilla, Pyracantha, Ranunculus, Rhododendron, Rosa, Rudbeckia, Senecio, Silene, Silphium, Sinapsis, Solanum tuberosum, Sorbus, Spartium, Tecoma, Torenia, Tragopogon, Trollius, Tropaeolum, Tulipa, Tussilago, Ulex, Viola oder Zinnia.

- In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind die genetisch veränderten Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität in Früchten aufweisen ausgewählt aus den Pflanzengattungen Actinophloeus, Aglaeonema, Ananas, Arbutus, Archontophoenix, Area, Aronia, Asparagus, Avocado, Attalea, Berberis, Bixia, Brachyichilum, Bryonia, Caliptocalix, Capsicum, Carica, Celastrus, Citrullus, Citrus, Convallaria, Cotoneaster, Crataegus, Cucumis, Cucurbita, Cuscuta, Cycas, Cyphomandra, Dioscorea, Diospyrus, Dura, Elaeagnus, Elaeis, Erythroxylon, Euonymus, Erbse, Ficus, Fortunella, Fragaria, Gardinia, Gonocaryum, Gossypium, Guava, Guilielma, Hibiscus, Hippophaea, Iris, Kiwi, Lathyrus, Lonicera, Luffa, Lycium, Lycopersicum, Mais, Malpighia, Mangifera, Mormodica, Murraya, Musa, Nenga, Orange, Palisota, Pandanus, Passiflora, Persea, Physalis, Prunus, Ptychandra, Punica, Pyracantha, Pyrus, Ribes, Rosa, Rubus, Sabal, Sambucus, Seaforita, Shepherdia, Solanum, Sorbus, Synspadix, Tabernae, Tamus, Taxus, Trichosanthes, Triphasia, Vaccinium, Viburnum, Vigna, Vitis oder Zucchini verwendet.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind die genetisch veränderten Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität in Knollen aufweisen *Solanum tuberosum*.

- 5 Besonders bevorzugte Pflanzen weisen als Wildtyp am Gesamtcarotinoidgehalt in Pflanzengeweben, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide einen höheren Anteil an α -Carotinoiden als β -Carotinoiden auf.

- 10 Besonderes bevorzugt sind genetisch veränderte Pflanzen der Gattung *Tagetes*, enthaltend mindestens eine Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

- 15 Besonders bevorzugte Pflanzen sind Marigold, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula* wobei die Herstellung der β -Carotinoide, vorzugsweise Zeaxanthin, in Blüten, besonders bevorzugt in den Petalen stattfindet.

- 20 Besonders bevorzugte Pflanzengewebe, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide sind die Wurzelknolle von *Solanum tuberosum*, die Samenfrüchte von *Zea Mais*, die Blüte von *Tagetes erecta* und die Blüte von *Calendula officinalis*.

- 25 Die genetisch veränderten Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile, insbesondere deren Blütenblätter, Knollen oder Früchte sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

- 30 Die genetisch veränderten Pflanzen können, wie vorstehend beschrieben, zur Herstellung von β -Carotinoiden, insbesondere β -Carotin und Zeaxanthin verwendet werden.

- 35 Von Menschen und Tieren verzehrbare erfindungsgemäße, genetisch veränderte Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an β -Carotinoiden können auch beispielsweise direkt oder nach an sich bekannter Prozessierung als Nahrungsmittel oder Futtermittel oder als Futter- und Nahrungsergänzungsmittel verwendet werden. Ferner können die genetisch veränderten Pflanzen zur Herstellung von β -Carotinoid-haltigen Extrakten der Pflanzen und/oder zur Herstellung von Futter- und Nahrungsergänzungsmitteln verwendet werden.

- 40 Zeaxanthinhaltige Extrakten können zur Pigmentierung von Tierprodukten insbesondere der Familie Galiformes, verwendet werden. Die Pigmentierung erfolgt

durch orale Verabreichung der zeaxanthinhaltigen Extrakte, die dem jeweiligen Tier entsprechend prozessiert und zu oralen Verabreichung aufbereitet wurden. Unter Tierprodukten werden insbesondere Haut, Fleisch, Feder und Eidotter verstanden

- 5 Die genetisch veränderten Pflanzen können auch als Zierpflanzen im Horticulture-Bereich verwendet werden.

- 10 Die genetisch veränderten Pflanzen weisen im Vergleich zum Wildtyp einen erhöhten Gehalt an β -Carotinoiden in Pflanzengeweiben, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, auf.

Unter einem erhöhten Gehalt an β -Carotinoiden wird in der Regel ein erhöhter Gehalt an Gesamt- β -Carotinoid verstanden.

- 15 Unter einem erhöhten Gehalt an β -Carotinoiden wird aber auch insbesondere ein veränderter Gehalt der bevorzugten β -Carotinoide verstanden, ohne dass zwangsläufig der Gesamt-Carotinoidgehalt erhöht sein muss.

- 20 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform weisen die erfindungsgemäßen, genetisch veränderten Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp in Pflanzengeweiben, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, einen erhöhten Gehalt an β -Carotin oder Zeaxanthin, insbesondere Zeaxanthin auf.

- 25 Unter einem erhöhten Gehalt wird in diesem Fall auch ein verursachter Gehalt an β -Carotinoiden, bzw. β -Carotin oder Zeaxanthin verstanden.

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

- 30 Allgemeine Experimentelle Bedingungen:
Sequenzanalyse rekombinanter DNA

- 35 Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467).

Beispiel 1: Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der chromoplastenspezifischen Lycopin β cyclase aus *Lycopersicon esculentum* unter Kontrolle des Promoters P76

- 5 a) Isolation von Promoter P76 mittels PCR mit genomischer DNA von *Arabidopsis thaliana* als Matrize.

10 Hierzu wurden die Oligonukleotid Primer SEQ. ID. No. 20 (P76for) und SEQ. ID. NO. 21 (P76rev) verwendet. Die Oligonukleotide wurden bei der Synthese mit einem 5' Phosphatrest versehen. Die genomische DNA wurde aus *Arabidopsis thaliana* wie beschrieben (Galbiati M et al. Funct. Integr. Genomics 2000, 20 1:25-34) isoliert.

Die PCR Amplifikation wurde wie folgt durchgeführt:

- 15 80ng genomische DNA
1x Expand Long Template PCR Puffer
2,5 mM MgCl₂
je 350 μ M dATP, dCTP, dGTP, dTTP
je 300 nM eines jeden Primers
20 2,5 Units Expand Long Template Polymerase
in einem Endvolumen von 25 μ l

Folgendes Temperaturprogramm wird verwendet:

- 25 1 Zyklus mit 120 sec bei 94°C
35 Zyklen mit 94°C für 10 sec, 48°C für 30 sec und 68°C für 3 min
1 Zyklus mit 68°C für 10 min

- 30 Das PCR Produkt (SEQ. ID. NO. 22) wird mit Agarosegelelektrophorese gereinigt und das 1032 bp Fragment durch Gelelution isoliert.

Der Vektor pSun5 wird mit der Restriktionsendonuklease EcoRV verdaut und ebenfalls über Agarosegelelektrophorese aufgereinigt und durch Gelelution gewonnen.

- 35 Das gereinigte PCR Produkt wird in den so behandelten Vektor kloniert.

Um die Orientierung des Promotors im Vektor zu überprüfen wird mit der Restriktionsendonuklease BamHI verdaut. Entsteht hierbei ein 628 bp Fragment ist die Orientierung entsprechend der Abb. 2.

Dieses Konstrukt wird mit p76 bezeichnet.

- b) Isolation der Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase (Bgene) mittels PCR mit genomischer DNA von *Lycopersicon esculentum* als Matrize.

5

Hierzu wurden die Oligonukleotid Primer SEQ. ID. NO. 23 (BgeneFor) und SEQ. ID. NO. 24 (BgeneRev) verwendet. Die Oligonukleotide wurden bei der Synthese mit einem 5' Phosphatrest versehen. Die genomische DNA wurde aus *Lycopersicon esculentum* wie beschrieben (Galbiati M et al. Funct. Integr. Genomics 2000, 20 1:25-34) isoliert.

10

Die PCR Amplifikation wurde wie folgt durchgeführt:

- 80ng genomische DNA
- 15 1x-Expand Long Template PCR Puffer
- 2,5 mM MgCl₂
- je 350 μ M dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- je 300 nM eines jeden Primers
- 2,5 Units Expand Long Template Polymerase
- 20 in einem Endvolumen von 25 μ l

Folgendes Temperaturprogramm wurde verwendet:

- 1 Zyklus mit 120 sec bei 94°C
- 25 35 Zyklen mit 94°C für 10 sec, 48°C für 30 sec und 68°C für 3 min
- 1 Zyklus mit 68°C für 10 min

Das PCR Produkt wurde mit Agarosegelelektrophorese gereinigt und das 1486 bp Fragment durch Gelelution isoliert.

30

Der Vektor p76 wird mit der Restriktionsendonuklease SmaI verdaut und ebenfalls über Agarosegelelektrophorese aufgereinigt und durch Gelelution gewonnen.

Das gereinigte PCR Produkt wird in den so behandelten Vektor kloniert.

35

Um die Orientierung von Bgene im Vektor zu überprüfen wird mit der Restriktionsendonuklease EcoRI verdaut. Entsteht hierbei ein 445 bp Fragment ist die Orientierung entsprechend der Abb. 2.

Dieses Konstrukt wird mit p76Bgene bezeichnet.

40

Beispiel 2: Herstellung eines Klonierungsvektors zur Herstellung von doppelsträngigen ϵ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenz-Expressionskassetten für die blütenspezifischen Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta*

5

Die Expression von Inverted-Repeat Transkripten bestehend aus Fragmenten der Epsilon-Cyclase in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion 9298-10200; Hill et al. (1998) Development 125: 1711-1721)

10

Das Inverted-Repeat Transkript enthält jeweils ein Fragment in korrekter Orientierung (Sense-Fragment) und ein sequenzidentisches Fragment in entgegengesetzter Orientierung (Antisense-Fragment), die durch ein funktionelles Intron, das PIV2 Intron des ST-LH1 Genes aus Kartoffel (Vancanneyt G. et al. (1990) Mol Gen Genet 220: 245-50) mit einander verbunden sind.

15

Die cDNA, die für den AP3 Promoter (-902 bis +15) aus *Arabidopsis thaliana* kodiert, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethode aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) und der Primer PR7 (SEQ ID No. 25) und PR10 (SEQ ID No. 28) hergestellt.

20

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (-902 bis +15) kodiert, erfolgte in einem 50 μ l Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

25

- 1 ml genomischer DNA aus *A.thaliana* (1:100 verd hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 mM PR7 (SEQ ID No. 25)
- 0,2 mM PR10 (SEQ ID No. 28)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0,25 ml Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28,8 ml Aq. Dest.

30

35

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X 94°C 2 Minuten

35X 94°C 1 Minute

40

50°C 1 Minute

72°C 1 Minute

1X 72°C 10 Minuten

Das 922 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pTAP3 erhalten. Sequenzierung des Klon pTAP3 bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion (ein G in Position 9765 der Sequenz AL132971) und einen Basenaustausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz AL132971) von der publizierten AP3 Sequenz (AL132971, Nukleotidregion 9298-10200) unterscheidet (Position 33: T statt G, Position 55: T statt G). Diese Nukleotidunterschiede wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanze.

Die modifizierte Version AP3P wurde mittels rekombinanter PCR unter Verwendung des Plasmids pTAP3 hergestellt. Die Region 10200-9771 wurde mit den Primern PR7 (SEQ ID No. 25) und Primern PR9 (SEQ ID No. 27) amplifiziert (Amplifikat A7/9), die Region 9526-9285 wurde mit den PR8 (SEQ ID No. 26) und PR10 (SEQ ID No. 28) amplifiziert (Amplifikat A8/10).

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die für die Regionen Region 10200-9771 und 9526-9285 des AP3 Promoters kodieren, erfolgte in 50 µl Reaktionsansätzen, in denen enthalten war:

- 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 mM PR7 (SEQ ID No. 15) bzw. PR8. (SEQ ID No. 26)
- 0,2 mM PR9 (SEQ ID No. 17) bzw. PR10 (SEQ ID No. 28)
- 5 µl 10 X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0,25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28,8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 1 X 94°C 2 Minuten
- 35 X 94°C 1 Minute
- 50°C 2 Minuten
- 72°C 3 Minuten

1 X 72°C 10 Minuten

Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A7/9 und A8/10, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte Version des AP3 Promoters, AP3P, in dem die Positionen 9670-9526 deletiert sind. Die Denaturierung (5 min bei 95°C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40°C) beider Amplifikate A7/9 und A8/10 erfolgte in einem 17.6 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

10

- 0,5 mg A7/9
- 0,25 mg A8/10

15

Das Auffüllen der 3'Enden (30 min bei 30°C) erfolgte in einem 20 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

20

- 17,6 ml A7/9 und A8/10-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 mM dNTPs
- 2 ml 1 X Klenow Puffer
- 2 U Klenow Enzym

25

Die Nukleinsäure kodierend für die modifizierte Promoterversion AP3P wurde mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR7 SEQ ID No. 25) und eines antisense spezifischen Primers (PR10 SEQ ID No. 28) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

30

Die PCR zur Amplifikation des AP3P Fragmentes erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

35

- 1 µl Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 mM PR7 (SEQ ID No. 25)
- 0,2 mM PR10 (SEQ ID No. 28)
- 5 µl 10 X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0,25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28,8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 1 X 94°C 2 Minuten
- 5 35 X 94°C 1 Minute
- 50°C 1 Minuten
- 72°C 1 Minuten
- 1 X 72°C 10 Minuten

- 10 Die PCR-Amplifikation mit PR7, SEQ ID No. 25 und PR10 SEQ ID No. 28 resultierte in einem 778 Bp Fragment das für die modifizierte Promoterversion AP3P kodiert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz AL132971, Region 10200-9298 identische Sequenz, wobei die interne Region 9285-9526 deletiert wurde.
- 15 Diese Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

- 20 Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pTAP3P und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter AP3P anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heißt pJAP3P.

- 25 Ein DNA-Fragment, das das PIV2 Intron des Gens ST-LS1 enthält wurde mittels PCR unter Verwendung von Plasmid-DNA p35SGUS INT (Vancanneyt G. et al.(1990) Mol Gen Genet 220: 245-50) sowie der Primer PR40 (Seq ID No. 30) und Primer PR41 (Seq ID No. 31) hergestellt.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

- 30 Die PCR zur Amplifikation der Sequenz des Intron PIV2 des Gens ST-LS1, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:
- 1 ml p35SGUS INT
 - 0,25 mM dNTPs
 - 35 - 0,2 mM PR40 (SEQ ID No. 30)
 - 0,2 mM PR41 (SEQ ID No. 31)
 - 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
 - 0,25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
 - 28,8 ml Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 1X 94°C 2 Minuten
- 5 35X 94°C 1 Minute
- 53°C 1 Minute
- 72°C 1 Minute
- 1X 72°C 10 Minuten

- 10 Die PCR-Amplifikation mit PR40 und PR41 resultierte in einem 206 Bp-Fragment. Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pBluntII (Invitrogen) kloniert und der Klon pBluntII-40-41 erhalten. Sequenzierungen dieses Klon mit dem Primer SP6 bestätigte eine Sequenz, die identisch ist mit der entsprechenden Sequenz aus dem Vektor p35SGUS INT.

- 15 Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Vektor pJAP3P (oben beschrieben).

- 20 Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 206 Bp Sall-BamHI Fragmentes aus pBluntII-40-41 und Ligierung mit dem Sall-BamHI geschnittenen Vektor pJAP3P. Der Klon, der das Intron PIV2 des Gens ST-LS1 in der korrekten Orientierung anschließend an das 3'Ende des rbcS Transitpeptides enthält, heißt pJAI1 und ist geeignet, Expressionskassetten für die blütenspezifische Expression von Inverted-Repeat Transkripten herzustellen.

- 25 In der Abbildung 3 beinhaltet Fragment *AP3P* den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment *rbcS* das rbcS Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment *intron* das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, und Fragment *term* (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

- 30 Beispiel 3: Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die blüten-spezifische Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta* (gerichtet gegen die 5'Region der Epsilon-Cyclase cDNA)

- 35 Die Nukleinsäure, die die 5'terminale 435bp Region der Epsilon-Cyclase cDNA (Genbank accession no. AF251016) enthält, wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Tagetes erecta* cDNA unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR42 SEQ ID NO. 32) und eines antisense spezifischen Primers (PR43 SEQ ID NO. 33) amplifiziert. Die 5'terminale 435 bp Region der Epsilon-Cyclase cDNA aus *Tagetes erecta* setzt sich zusammen aus 138 bp 5'Nicht-translatierter Sequenz
- 40 (5'UTR) und 297 bp der dem N-Terminus entsprechenden kodierenden Region.

Für die Präparation von Total-RNA aus Blüten von Tagetes wurden 100 mg der gefrorenen, pulverisierten Blüten in ein Reaktionsgefäß überführt und in 0,8 ml Trizol-Puffer (LifeTechnologies) aufgenommen. Die Suspension wurde mit 0,2 ml Chloroform extrahiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12000 g wurde der wässrige Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Ethanol extrahiert. Die RNA wurde mit einem Volumen Isopropanol gefällt, mit 75% Ethanol gewaschen und das Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser mit 1/1000 Volumen Diethylpyrocarbonat bei Raumtemperatur, anschließend autoklaviert) gelöst. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Für die cDNA-Synthese wurden 2,5 µg Gesamt-RNA für 10 min bei 60°C denaturiert, für 2 min auf Eis abgekühlt und mittels eines cDNA-Kits (Ready-to-go-you-prime-beads, Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben unter Verwendung eines antisense spezifischen Primers (PR17 SEQ ID NO. 29) in cDNA umgeschrieben.

Die Bedingungen der anschließenden PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR42-PR43 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 435bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 mM PR42 (SEQ ID No. 32)
- 0,2 mM PR43 (SEQ ID No. 33)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28,8 µl Aq. Dest.

Die PCR zur Amplifikation des PR44-PR45 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 435 bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 mM PR44 (SEQ ID No. 34)
- 0,2 mM PR45 (SEQ ID No. 35)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)

- 1X 94°C 2 Minuten
35X 94°C 1 Minute
58°C 1 Minute
72°C 1 Minute
5 1X 72°C 10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR42 und PR43 resultierte in einem 443 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit Primer PR44 und PR45 resultierte in einem 444 Bp-Fragment.

10

Die beiden Amplifikate, das PR42-PR43 (HindIII-Sall sense) Fragment und das PR44-PR45 (EcoRI-BamHI antisense) Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine zur publizierten Sequenz

15

AF251016 (SEQ ID No. 7) identische Sequenz abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen. Diese Klon wurde daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel 2) verwendet.

20

Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 444 Bp PR44-PR45 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAI1. Der Klon, der 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase in der antisense Orientierung enthält, heißt pJAI2. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem antisense Fragment der 5'terminalen Region der Epsilon-Cyclase und dem Polyadenylierungssignal aus CaMV.

25

Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 443 Bp PR42-PR43 HindIII-Sall Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem HindIII-Sall geschnittenen Vektor pJAI2. Der Klon, der 435 bp 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase cDNA in der sense Orientierung enthält, heißt pJAI3. Durch die

30

Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem AP3P und dem sense Fragment der 5'terminalen Region der Epsilon-Cyclase.

35

Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle des CHRC-Promoters wurde ein CHRC-Promoterfragment unter Verwendung genomischer DNA aus Petunie (nach Standardmethoden hergestellt) sowie der Primer PRCHRC5 (SEQ ID No. 50) und PRCHRC3 (SEQ ID No. 51) amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen des resultierenden Klons pCR2.1-CHRC mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz AF099501 identische Sequenz. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung

40

in den Expressionsvektor pJAI3 verwendet.

in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen des resultierenden Klon pCR2.1-CHRC mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz AF099501 identische Sequenz. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJA13 verwendet.

5

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1537 bp SacI-HindIII Fragments aus pCR2.1-CHRC und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJA13. Der Klon, der den Promoter CHRC anstelle des ursprünglichen Promoters AP3P enthält, heißt pJCI3.

10

Die Herstellung der Expressionsvektoren für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P- bzw. CHRC-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

15

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5A13 wurde das 2622 bp SacI-XhoI Fragment aus pJA13 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 4, Konstruktkarte).

20

In der Abbildung 4 beinhaltet Fragment *AP3P* den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment *5sense* die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Sense-Orientierung, Fragment *intron* das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment *5anti* die 5'Region der Epsilon-cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in antisense Orientierung, und Fragment *term* (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

25

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5CI3 wurde das 3394 bp SacI-XhoI Fragment aus pJCI3 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 5, Konstruktkarte).

30

In der Abbildung 5 beinhaltet Fragment *CHRC* den Promoter (1537 bp), Fragment *5sense* die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Sense-Orientierung, Fragment *intron* das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment *5anti* die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Antisense-Orientierung, und Fragment *term* (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

35

Beispiel 4: Herstellung einer Inverted-Repeat-Expressionskassette für die blüten-spezifische Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta* (gerichtet gegen die 3'-Region der Epsilon-Cyclase cDNA)

- 5 Die Nukleinsäure, die die 3'terminale Region (384 bp) der Epsilon-Cyclase cDNA (Genbank accession no. AF251016) enthält wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Tagetes erecta* cDNA unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR46 SEQ ID NO. 36) und eines antisense spezifischen Primers (PR47 SEQ ID NO. 37) amplifiziert. Die 3'terminale Region (384 bp) der Epsilon-Cyclase cDNA aus
- 10 *Tagetes erecta* setzt sich zusammen aus 140 bp 3'-Nicht-translatierter Sequenz (3'UTR) und 244 bp der dem C-Terminus entsprechenden kodierenden Region.

Die Präparation von Total-RNA aus Blüten von *Tagetes* erfolgte wie unter Beispiel 3 beschrieben.

- 15 Die cDNA Synthese erfolgte wie unter Beispiel 2 unter Verwendung des antisense spezifischen Primers PR17 (SEQ ID No. 19) beschrieben.

Die Bedingungen der anschließenden PCR-Reaktionen waren die folgenden:

- 20 Die PCR zur Amplifikation des PR46-PR457 DNA-Fragmentes, das die 3'terminale 384 bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 25 - 1 ml cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 mM PR46 (SEQ ID No. 36)
- 0,2 mM PR47 (SEQ ID No. 37)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 30 - 0,25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28,8 ml Aq. Dest.

- 35 Die PCR zur Amplifikation des PR48-PR49 DNA-Fragmentes, das die 3'terminale 384 bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 mM PR48 (SEQ ID No. 38)

- 0,2 mM PR49 (SEQ ID No. 39)
- 5 ml 10 X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28,8 ml Aq. Dest.

5

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X 94°C 2 Minuten

35X 94°C 1 Minute

10 58°C 1 Minute

72°C 1 Minute

1X 72°C 10 Minuten

15

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO.36 und SEQ ID NO. 37 resultierte in einem 392 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO.38 und SEQ ID NO. 39 resultierte in einem 396 Bp-Fragment.

20

Die beiden Amplifikate, das PR46-PR47 Fragment und das PR48-PR49 Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine zur publizierten Sequenz AF251016 (SEQ ID NO. 7) identische Sequenz abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen. Diese Klone wurde daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel 2) verwendet.

25

Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 396 Bp PR48-PR49 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAI1. Der Klon, der 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase in der antisense Orientierung enthält, heißt pJAI4. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem Antisense-Fragment der 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase und dem Polyadenylierungssignal aus CaMV.

30

Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 392 Bp PR46-PR47 HindIII-Sall Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem HindIII-Sall geschnittenen Vektor pJAI4. Der Klon, der 392 bp 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase cDNA in der sense Orientierung enthält, heißt pJAI5. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem AP3P und dem Sense-Fragmente 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase.

35

Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation des AP3P-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900). Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5A15 wurde das 2523 bp SacI-XhoI Fragment aus pJA15 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 5, Konstruktkarte).

In der Abbildung 5 beinhaltet Fragment *AP3P* den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment *sense* die 3'region der Epsilon cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in sense Orientierung, Fragment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment *anti* die 3'region der Epsilon cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in anti-sense Orientierung, und Fragment *term* (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

Beispiel 5: Klonierung des Epsilon-Cyclase Promoters

Ein 199 bp Fragment bzw. das 312 bp Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters wurde durch zwei unabhängige Klonierungsstrategien, Inverse PCR (adaptiert Long et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 90: 10370) und TAIL-PCR (Liu Y-G. et al. (1995) Plant J. 8: 457-463) unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethode aus *Tagetes erecta*, Linie Orangenprinz, isoliert) isoliert.

Für den Inverse PCR-Ansatz wurden 2 µg genomische DNA in einem 25 µl Reaktionsansatz mit EcoRV und RsaI verdaut, anschließend auf 300 µl verdünnt und über Nacht bei 16°C mit 3U Ligase religiert. Unter Verwendung der Primer PR50 (SEQ ID NO. 40) und PR51 (SEQ ID NO. 41) wurde durch PCR Amplifikation ein Fragment hergestellt, das, jeweils in Sense-Orientierung, 354 bp der Epsilon-Cyclase cDNA (Genbank Accession AF251016), ligiert an 300 bp des Epsilon-Cyclase Promoters sowie 70 bp des 5'terminalen Bereichs der cDNA Epsilon-Cyclase enthält (siehe Abbildung 7).

Die Bedingungen der PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR50-PR51 DNA-Fragmentes, das unter anderem das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml Ligationsansatz (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 mM PR50 (SEQ ID No. 40)
- 0,2 mM PR51 (SEQ ID No. 41)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)

- 0,25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28,8 ml Aq. Dest.

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 5
- 1X 94°C 2 Minuten
 - 35X 94°C 1 Minute
 - 53°C 1 Minute
 - 72°C 1 Minute
- 10 1X 72°C 10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR50 und PR51 resultierte in einem 734 Bp-Fragment, das unter anderem das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält (Abbildung 7).

- 15
- Das Amplifikat, wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern M13 und T7 ergaben die Sequenz SEQ ID No. 9. Diese Sequenz wurde in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten *Tagetes erecta* Linie Orangenprinz.
- 20

Für den TAIL-PCR Ansatz wurden drei sukzessive PCR-Reaktionen mit jeweils unterschiedlichen gen-spezifischen Primern (nested primers) durchgeführt.

- 25 Die TAIL1-PCR erfolgte in einem 20 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ng genomische DNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,2 mM jedes dNTPs
- 0,2 mM PR60 (SEQ ID No. 42)
- 30 - 0,2 mM AD1 (SEQ ID No. 45)
- 2 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,5 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- mit Aq. Dest. auf 20 µl aufgefüllt

- 35 AD1 stellte dabei zunächst eine Mischung aus Primern der Sequenzen (a/c/g/t)tcga(g/c)t(a/t)t(g/c)g(a/t)ggt dar.

Die PCR-Reaktion TAIL1 wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt

- 1X 93°C: 1 Min., 95°C: 1 Min.
- 5X 94°C: 30 Sek., 62°C: 1 Min., 72°C: 2,5 Min.
- 5 1X 94°C: 30 Sek., 25°C: 3 Min., ramp to 72°C in 3 Min.
- 72°C: 2,5 Min
- 15X 94°C: 10 Sek., 68°C: 1 Min., 72°C: 2,5 Min.;
- 94°C: 10 Sek., 68°C: 1 Min., 72°C: 2,5 Min.;
- 94°C: 10 Sek., 29°C: 1 Min., 72°C: 2,5 Min.
- 10 1X 72°C: 5 Min.

Die TAIL2-PCR erfolgte in einem 21 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1. ml einer 1:50 Verdünnung des TAIL1-Reaktionsansatzes
- 15 (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,8 mM dNTP
- 0,2 mM PR61 (SEQ ID No. 43)
- 0,2 mM AD1 (SEQ ID No. 45)
- 2 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 20 - 0,5 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- mit Aq. Dest. auf 21 ul aufgefüllt

Die PCR-Reaktion TAIL2 wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 25 12X 94°C: 10 Sekunden, 64°C: 1 Minute, 72°C: 2.5 Minuten;
- 94°C: 10 Sekunden, 64°C: 1 Minute, 72°C: 2.5 Minuten;
- 94°C: 10 Sekunden, 29°C: 1 Minute, 72°C: 2.5 Minuten
- 1X 72°C: 5 Minuten

30 Die TAIL3-PCR erfolgte in einem 100 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml einer 1:10 Verdünnung des TAIL2-Reaktionsansatzes
- (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,8 mM dNTP
- 35 - 0,2 mM PR63 (SEQ ID No. 44)
- 0,2 mM AD1 (SEQ ID No. 45)
- 10 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,5 ml R Taq Polymerase (TAKARA)

- mit Aq. Dest. auf 100 µl aufgefüllt

Die PCR-Reaktion TAIL3 wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 5 20X 94°C: 15 Sekunden, 29°C: 30 Sekunden, 72°C: 2 Minuten
 1X 72°C: 5 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR63 und AD1 resultierte in einem 280 Bp-Fragment, das unter anderem das 199 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält (Abbildung 8).

Das Amplifikat, wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern M13 und T7 ergaben die Sequenz SEQ ID No. 9. Diese Sequenz ist identisch mit der ecyclase Region innerhalb der Sequenz SEQ ID No. 7, die mit der IPCR Strategie isoliert wurde, und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten *Tagetes erecta* Linie Orangenprinz.

Der pCR2.1-Klon, der das 312 bp Fragment (SEQ ID No. 9) des Epsilon-Cyclase Promoters, das durch die IPCR-Strategie isoliert wurde, enthält, heißt pTA-ecycP und wurde für die Herstellung der IR Konstrukte verwendet.

Beispiel 6: Herstellung einer Inverted-Repeat-Expressionskassette für die blütenspezifische Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta* (gerichtet gegen die Promoterregion der Epsilon-Cyclase cDNA).

Die Expression von Inverted-Repeat Transkripten bestehend aus Promoterfragmenten der Epsilon-cyclase in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis* (siehe Beispiel 2) oder des blütenspezifischen Promoters CHRC (Genbank accession no. AF099501). Das Inverted-Repeat Transkript enthält jeweils ein Epsilon-Cyclase-Promoterfragment in korrekter Orientierung (Sense-Fragment) und ein sequenzidentisches Epsilon-Cyclase-Promoterfragment in entgegengesetzter Orientierung (Antisense-Fragment), die durch ein funktionelles Intron (siehe Beispiel 2) miteinander verbunden sind.

Die Promoterfragmente wurde mittels PCR unter Verwendung von Plasmid-DNA (Klon pTA-ecycP, siehe Beispiel 5) und der Primer PR124 (SEQ ID No. 46) und PR126 (SEQ ID No. 48) bzw. der Primer PR125 (SEQ ID No. 47) und PR127 (SEQ ID No. 49) hergestellt.

Die Bedingungen der PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR124-PR126 DNA-Fragmentes, das das Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 mM PR124 (SEQ ID No. 46)
- 10 - 0,2 mM PR126 (SEQ ID No. 48)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28,8 µl Aq. Dest.

15 Die PCR zur Amplifikation des PR125-PR127 DNA-Fragmentes, das das 312bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 20 - 0,25 mM dNTPs
- 0,2 mM PR125 (SEQ ID No. 47)
- 0,2 mM PR127 (SEQ ID No. 49)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25 - 28,8 µl Aq. Dest.

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 1X 94°C 2 Minuten
- 30 35X 94°C 1 Minute
- 53°C 1 Minute
- 72°C 1 Minute
- 1X 72°C 10 Minuten

35 Die PCR-Amplifikation mit Primer PR124 und PR126 resultierte in einem 358 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit Primer PR125 und PR127 resultierte in einem 361 Bp-Fragment.

Die beiden Amplifikate, das PR124-PR126 (HindIII-Sall sense) Fragment und das PR125-PR127 (EcoRI-BamHI antisense) Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine Sequenz, die abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen identisch ist zu SEQ ID No. 7. Diese

5 Klonen wurden daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJA11 (siehe Beispiel 2) verwendet.

Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 358 Bp PR124-PR126 HindIII-Sall Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJA11. Der Klon, das Epsilon-Cyclase Promoterfragment in der sense Orientierung enthält, heißt cs43. Durch die Ligation wird das Sense-Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters zwischen den AP3P Promoter und das Intron eingefügt.

Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 361Bp PR125-PR127 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor cs43. Der Klon, der das Epsilon-Cyclase Promoterfragment in der antisense Orientierung enthält, heißt cs44. Durch

20 die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem Intron und dem Antisense-Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters.

Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle des CHRC-Promoters wurde ein CHRC-Promoterfragment unter Verwendung genomischer

25 DNA aus Petunie (nach Standardmethoden hergestellt) sowie der Primer PRCHRC3' (SEQ ID NO. 51) und PRCHRC5' (SEQ ID NO. 50) amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen des resultierenden Klonen pCR2.1-CHRC mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz AF099501 identische Sequenz. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den

30 Expressionsvektor cs44 verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1537 bp SacI-HindIII Fragments aus pCR2.1-CHRC und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor cs44. Der Klon, der den Promoter CHRC anstelle des ursprünglichen Promoters AP3P enthält, heißt

35 cs45.

Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle zweier Promotoren, des CHRC-Promoter und des AP3P-Promoters, wurde der AP3P-Promoter in antisense Orientierung an den 3'Terminus des Epsilon-Cyclase antisense

40 Fragmentes in cs45 kloniert. Das AP3P-Promoterfragments aus pJA11 wurde unter

Verwendung der Primer PR128 und PR129 amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Dieser Klon pCR2.1-AP3PSX wurde für Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle zweier Promotoren verwendet.

5

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 bp Sall-XhoI Fragments aus pCR2.1-AP3PSX und Ligierung in den XhoI geschnittenen Vektor cs45. Der Klon, der 3'seitig des Inverted Repeats, den Promoter AP3P in antisense Orientierung enthält, heißt cs46.

10

Die Herstellung der Expressionsvektoren für die Agrobacterium-vermittelte Transformation des AP3P-kontrollierten Inverted-Repeat-Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

15

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5A17 wurde das 1685bp SacI-XhoI Fragment aus cs44 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 9, Konstruktkarte).

20

In der Abbildung 9 beinhaltet Fragment *AP3P* den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment *P-sense* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), und Fragment *P-anti* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon- Cyclase in antisense Orientierung.

25

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5C17 wurde das 2445bp SacI-XhoI Fragment aus cs45 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 10, Konstruktkarte).

30

In der Abbildung 10 beinhaltet Fragment *CHRC* den CHRC-Promoter (1537 bp), Fragment *P-sense* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), und Fragment *P-anti* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon- Cyclase in antisense Orientierung.

35

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5C17 wurde das 3219bp SacI-XhoI Fragment aus cs46 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 11, Konstruktkarte).

40

In der Abbildung 11 beinhaltet Fragment *CHRC* den CHRC-Promoter (1537 bp), Fragment *P-sense* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense

Orientierung, Fragment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), Fragment *P-anti* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in antisense Orientierung und das Fragment *AP3P* das 771 bp AP3P-Promoterfragment in antisense Orientierung.

5 Beispiel 7: Herstellung transgener Tagetes Pflanzen

Tagetessamen werden sterilisiert und auf Keimungsmedium (MS-Medium; Murashige and Skoog, Physiol. Plant. 15(1962), 473-497) pH 5,8, 2 % Saccharose) aufgelegt. Die Keimung erfolgt in einem Temperatur/Licht/Zeitintervall von 18 bis 28°C/20 bis 200 μ E/3 bis 16 Wochen, bevorzugt jedoch bei 21°C, 20 bis 70 μ E, für 4 bis 8 Wochen.

Alle Blätter der sich bis dahin entwickelten *in vitro* Pflanzen werden geerntet und quer zur Mittelrippe geschnitten. Die dadurch entstehenden Blattexplantate mit einer Größe von 10 bis 60 mm² werden im Verlaufe der Präparation in flüssigem MS-Medium bei Raumtemperatur für maximal 2 h aufbewahrt.

Der Agrobakterium *tumefaciens* Stamm EHA105 wurde mit dem Binärplasmid PS5A13 transformiert. Die Anzucht des transformierten *A. tumefaciens* Stammes EHA105 erfolgte über Nacht unter folgenden Bedingungen: Eine Einzelkolonie wurde in YEB (0,1 % Hefeextrakt, 0,5 % Rindfleischextrakt, 0,5 % Pepton, 0,5 % Saccharose, 0,5 % Magnesiumsulfat x 7 H₂O) mit 25 mg/l Kanamycin angeimpft und bei 28°C für 16 bis 20 h angezogen. Anschließend wurde die Bakteriensuspension durch Zentrifugation bei 6000 g für 10 min geerntet und derart in flüssigem MS Medium resuspendiert, dass eine OD₆₀₀ von ca. 0,1 bis 0,8 entstand. Diese Suspension wurde für die Co-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet.

Unmittelbar vor der Co-Kultivierung wird das MS-Medium, in dem die Blätter aufbewahrt worden sind, durch die Bakteriensuspension ersetzt. Die Inkubation der Blättchen in der Agrobakteriensuspension erfolgte für 30 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Anschließend werden die infizierten Explantate auf ein mit Agar (z.B. 0,8 % Plant Agar (Duchefa, NL) verfestigtes MS-Medium mit Wachstumsregulatoren, wie beispielsweise 3 mg/l Benzylaminopurin (BAP) sowie 1 mg/l Indolylessigsäure (IAA) aufgelegt. Die Orientierung der Blätter auf dem Medium ist bedeutungslos. Die Kultivierung der Explantate findet für 1 bis 8 Tage, bevorzugt aber für 6 Tage statt, dabei können folgende Bedingungen angewendet werden: Lichtintensität: 30 bis 80 μ Mol/m² x sec, Temperatur: 22 bis 24°C, hell/dunkel Wechsel von 16/8 Stunden. Anschließend werden die co-kultivierten Explantate auf frisches MS-Medium, bevorzugt mit den gleichen Wachstumsregulatoren übertragen, wobei dieses zweite Medium zusätzlich ein Antibiotikum zur Unterdrückung des Bakterienwachstums enthält. Timentin in einer Konzentration von 200 bis 500 mg/l ist für diesen Zweck sehr

geeignet. Als zweite selektive Komponente wird eine für die Selektion des Transformationserfolges eingesetzt. Phosphinothricin in einer Konzentration von 1 bis 5 mg/l selektiert sehr effizient, aber auch andere selektive Komponenten gemäß des zu verwendenden Verfahrens sind denkbar.

5

Nach jeweils ein bis drei Wochen erfolgt der Transfer der Explantate auf frisches Medium bis sich Sprossknospen und kleine Sprosse entwickeln, die dann auf das gleiche Basalmedium einschließlich Timentin und PPT oder alternative Komponenten mit Wachstumsregulatoren, nämlich z.B. 0,5 mg/l Indolylbuttersäure (IBA) und 0,5 mg/l Gibberillinsäure GA_3 , zur Bewurzelung übertragen werden. Bewurzelte Sprosse können ins Gewächshaus überführt werden.

10

Zusätzlich zu der beschriebenen Methode sind folgende vorteilhafte Modifikationen möglich:

15

- Bevor die Explantate mit den Bakterien infiziert werden, können sie für 1 bis 12 Tage, bevorzugt 3 bis 4, auf das oben beschriebene Medium für die Co-Kultur vorinkubiert werden. Anschließend erfolgt die Infektion, Co-Kultur und selektive Regeneration wie oben beschrieben.

20

- Der pH Wert für die Regeneration (normalerweise 5,8) kann auf pH 5,2 gesenkt werden. Dadurch wird die Kontrolle des Agrobakterienwachstums verbessert.
- Die Zugabe von $AgNO_3$ (3 bis 10 mg/l) zum Regenerationsmedium verbessert den Zustand der Kultur einschließlich der Regeneration selbst.

25

- Komponenten, die die Phenolbildung reduzieren und dem Fachmann bekannt sind, wie z.B. Zitronensäure, Ascorbinsäure, PVP u.v.a.m., wirken sich positiv auf die Kultur aus.

30

- Für das gesamte Verfahren kann auch flüssiges Kulturmedium Verwendung finden. Die Kultur kann auch auf handelsüblichen Trägern, die auf dem flüssigen Medium positioniert werden inkubiert werden.

35

Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden mit folgenden Expressionskonstrukten folgende Linien erhalten:

Mit p76Bgene (aus Beispiel 1) wurde erhalten: MK14-1-1

Mit pS5A13 wurde erhalten: CS30-1, CS30-3 und CS30-4

40

Beispiel 8: Charakterisierung der transgenen Pflanzen

Beispiel 8.1: CS30-1, CS30-3 und CS30-4

- 5 Das Blütenmaterial der transgenen *Tagetes erecta* Pflanzen CS30-1, CS30-3 und CS30-4 aus Beispiel 7 wurde in flüssigem Stickstoff gemörst und das Pulver (etwa 250 bis 500 mg) mit 100 % Aceton extrahiert (dreimal je 500 µl). Das Lösungsmittel wurde evaporiert und die Carotinoide in 100 µl Aceton resuspendiert.
- 10 Mittels einer C30-reverse phase-Säule konnte zwischen Mono- und Diestern der Carotinoide unterschieden werden. HPLC-Laufbedingungen waren nahezu identisch mit einer publizierten Methode (Frazer et al. (2000), Plant Journal 24(4):551-558). Eine Identifizierung der Carotinoide war aufgrund der UV-VIS-Spektren möglich.
- 15 Tabelle 1 zeigt das Carotinoidprofil in *Tagetes* petalen der gemäß der vorstehend beschriebenen Beispiele hergestellten transgenen *Tagetes*- und Kontroll*tagetes*pflanzen. Alle Carotinoidmengen sind in [µg/g] Frischgewicht angegeben, prozentuale Veränderungen gegenüber der Kontrollpflanze sind in Klammern angegeben. Im Vergleich zur genetisch nicht veränderten Kontrollpflanze, weisen die genetisch
- 20 veränderten Pflanzen einen deutlich erhöhten Gehalt an Carotinoiden des "β-Carotin-Weges", wie beispielsweise β-Carotin und Zeaxanthin und einen deutlich reduzierten Gehalt an Carotinoiden des "α-Carotin-Weges", wie beispielsweise Lutein auf.

Tabelle 1

25

Pflanze	Lutein	β-Carotin	Zeaxanthin	Violaxanthin	Gesamt-Carotinoide
Kontrolle	260	4,8	2,7	36	304
CS 30-1	35 (-86%)	13 (+170%)	4,4 (+62%)	59 (+63%)	111 (-63%)
Kontrolle	456	6,4	6,9	58	527
CS 30-3	62 (-86%)	13 (+103%)	8,9 (+29%)	75 (+29%)	159 (-70%)
CS 30-4	68 (-85%)	9,1 (+42%)	5,7 (-17%)	61 (+5%)	144 (-73%)
Kontrolle	280	4,1	2,6	42	329
CS 32-9	69 (-75%)	5,5 (+34%)	2,3 (-12%)	25 (-38%)	102 (-69%)

Beispiel 8.2: Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität in *Tagetes erecta* durch Antisense
CS 32-9

Unter Verwendung herkömmlicher, dem Fachmann bekannter Methoden wurde als
5 Vergleichsbeispiel eine *Tagetes erecta* Antisense-Linie CS32-9 hergestellt bei der die
Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität durch Antisense erfolgte. Das Carotinoidprofil
dieser Linie (CS32-9), gemessen nach vorstehend beschriebener Methode ist ebenfalls
in Tabelle 1 dargestellt.

10 Beispiel 8.3: Alkalische Hydrolyse von Carotinoidestern und Identifizierung der
Carotinoide von MK14-1-1

Die Blütenblätter der transgenen *Tagetes erecta* Pflanzen MK14-1-1 aus Beispiel 7
wurden in flüssigem Stickstoff gemörst und das Petalenpulver (etwa 20 mg) mit
15 100% Aceton extrahiert (dreimal je 500 μ l). Das Lösungsmittel wurde evaporiert und
der Rückstand in 180 μ l Aceton aufgenommen. Um Homogenität des Extraktes zu
gewährleisten wurde der Extrakt für zwei Minuten mit Ultraschall behandelt

Dem Extrakt wurden 20 μ l 10%ige KOH in Methanol zugesetzt und 30 min bei Raum-
20 temperatur bei 1000-1300 rpm geschüttelt. Hiernach wurde der Extrakt mit HCL auf
pH 7,5 titriert und bei 10000 g für 10 min zentrifugiert.

Der Überstand wurde mittels einer C30-reverse phase-Säule analysiert.
HPLC-Laufbedingungen waren nahezu identisch mit einer publizierten Methode
25 (Frazer et al.(2000), Plant Journal 24(4): 551-558). Eine Identifizierung der Carotinoide
war aufgrund der UV-VIS-Spektren und aufgrund der Massen möglich.

Die Überexpression der erfindungsgemäßen β Cyclase (Bgene) aus *Lycopersicon*
esculentum unter der Kontrolle des blütenspezifischen Promoters P76 aus *Arabidopsis*
30 *thaliana* in *Tagetes erecta* führte überraschend nicht nur zur Akkumulation von höheren
Mengen β Carotinoiden sondern zu einer drastischen Verringerung der Menge von
 α -Carotinoiden zugunsten der Menge von β Carotinoiden.

Hierdurch wurden die in der Blüte von *Tagetes erecta* vorhandenen α -Carotinoid
Mengen von im Wildtyp über 80 % auf unter 30 % der Gesamtcarotinoide reduziert und
35 der Anteil der β Carotinoide am Gesamtcarotinoidgehalt von im Wildtyp unter 20 % auf
über 70% erhöht (Siehe Abbildung 1).

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von β -Carotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität in Pflanzengeweben, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, aufweisen und die erhöhte β -Cyclase-Aktivität durch eine β -Cyclase verursacht wird, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, mit der Maßgabe, dass Tomate als Pflanze ausgenommen ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der β -Cyclase-Aktivität die Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, gegenüber dem Wildtyp erhöht.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Genexpression Nukleinsäuren in die Pflanzen einbringt, die β -Cyclasen kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 1 einbringt.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Expression der β -Cyclase unter Kontrolle eines Promotors stattfindet, der die Expression der β -Cyclase in den Pflanzengeweben, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, gewährleistet.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Pflanzengeweben, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, die höchste Expressionsrate der β -Cyclase aufweisen.
- 5 7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Expression der β -Cyclase unter Kontrolle eines für das Pflanzengewebe spezifischen Promotors erfolgt.
- 10 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanzen zusätzlich gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen.
- 15 9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass man zur zusätzlichen Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität, die Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase gegenüber dem Wildtyp erhöht.
- 20 10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Genexpression eine Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase in die Pflanze einbringt.
- 25 11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, Nukleinsäuren einbringt, die eine Hydroxylase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 9 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 9 aufweist.
- 30 12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 8 einbringt.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Pflanzengeweben, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, die höchste Expressionsrate der Hydro-

xylase aufweisen.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Expression der Hydroxylase unter Kontrolle eines für das Pflanzengewebe spezifischen Promotors erfolgt.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanzen gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe ϵ -Cyclase-Aktivität und endogene β -Hydroxylase Aktivität aufweisen.
16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass man die Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität und/oder der endogenen β -Hydroxylase Aktivität in Pflanzen durch mindestens eines der nachfolgenden Verfahren erreicht:
- a) Einbringen mindestens einer doppelsträngigen ϵ -Cyclase- Ribonukleinsäuresequenz und/oder endogenen β -Hydroxylase-Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen,
 - b) Einbringen mindestens einer ϵ -Cyclase-antisense-Ribonukleinsäuresequenz und/oder endogenen β -Hydroxylase-antisense-Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen,
 - c) Einbringen mindestens einer ϵ -Cyclase-antisense-Ribonukleinsäuresequenz und/oder endogenen β -Hydroxylase-antisense-Ribonukleinsäuresequenz jeweils kombiniert mit einem Ribozym oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen,
 - d) Einbringen mindestens einer ϵ -Cyclase-sense-Ribonukleinsäuresequenz und/oder endogenen β -Hydroxylase-sense-Ribonukleinsäuresequenz zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen,
 - e) Einbringen mindestens eines DNA-oder Protein-bindenden Faktors gegen ein ϵ -Cyclase-Gen, -RNA oder -Protein und/oder endogenes β -Hydroxylase-Gen,

-RNA oder -Protein oder einer dessen Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen,

5 f) Einbringen mindestens einer den ϵ -Cyclase-RNA und/oder endogenen β -Hydroxylase-RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenz oder Nukleinsäuresequenzen oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen,

10 g) Einbringen mindestens eines Konstruktes zur Erzeugung einer Insertion, Deletion, Inversion oder Mutation in einem ϵ -Cyclase-Gen und/oder endogenem β -Hydroxylase-Gen in Pflanzen.

17. Verfahren nach Anspruch 16, Ausführungsform a), dadurch gekennzeichnet, dass man in die Pflanze eine RNA einbringt, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

15 a) mit mindestens einem Teil des Pflanze-eigenen ϵ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder

20 b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase -Promotor-Sequenz identisch ist.

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass der Bereich mit Doppel-Strang-Struktur eine Nukleinsäuresequenz enthält, die mit mindestens einem

25 Teil des Pflanze-eigenen ϵ -Cyclase -Transkripts identisch ist und das 5'-Ende oder das 3'-Ende der Pflanze-eigenen Nukleinsäure, kodierend eine ϵ -Cyclase enthält.

19. Verfahren nach Anspruch 16, Ausführungsform a), dadurch gekennzeichnet, dass man in die Pflanze eine RNA einbringt, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

30

a) mit mindestens einem Teil des Pflanze-eigenen, endogenem β -Hydroxylase-Transkripts identisch ist und/oder

35 b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen, endogenen β -Hydroxylase -Promotor-Sequenz identisch ist.

20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass der Bereich mit Doppel-Strang-Struktur eine Nukleinsäuresequenz enthält, die mit mindestens einem Teil des Pflanze-eigenen, endogenen β -Hydroxylase -Transkripts identisch ist und das 5'-Ende oder das 3'-Ende der Pflanze-eigenen Nukleinsäure, kodierend eine endogene β -Hydroxylase enthält.
5
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Pflanzengeweben, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, die geringste Expressionsrate einer ϵ -Cyclase und/oder endogenen β -Hydroxylase aufweisen.
10
22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Transkription der doppelsträngigen Ribonukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 16, Ausführungsform a) und/oder der Antisense-Sequenzen gemäß Anspruch 16, Ausführungsform b) unter Kontrolle eines Promotors erfolgt, der für die Pflanzengewebe, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, spezifisch ist.
15
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass man nach dem Kultivieren die genetisch veränderten Pflanzen erntet und anschließend die β -Carotinoide aus den Pflanzen oder den Pflanzengewebe, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, isoliert.
20
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanzengewebe, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, ausgewählt sind aus der Gruppe Blüte, Frucht und Knolle.
25
25. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass man als genetisch veränderte Pflanze, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität in Blüten aufweist, eine Pflanze, ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassiceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Iliaceae oder Lamiaceae verwendet.
30
35

26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanze eine Pflanze, ausgewählt aus den Pflanzengattungen Marigold, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Acacia*, *Aconitum*, *Adonis*, *Arnica*, *Aquilegia*, *Aster*, *Astragalus*, *Bigonia*, *Calendula*, *Calendula officinalis*, *Caltha*, *Campanula*, *Canna*, *Centaurea*, *Cheiranthus*, *Chrysanthemum*, *Citrus*, *Crepis*, *Crocus*, *Curcubita*, *Cytisus*, *Delonia*, *Delphinium*, *Dianthus*, *Dimorphotheca*, *Doronicum*, *Eschscholtzia*, *Forsythia*, *Fremontia*, *Gazania*, *Gelsemium*, *Genista*, *Gentiana*, *Geranium*, *Gerbera*, *Geum*, *Grevillea*, *Helenium*, *Helianthus*, *Hepatica*, *Heracleum*, *Hisbiscus*, *Heliopsis*, *Hypericum*, *Hypóchoeris*, *Impatiens*, *Iris*, *Jacaranda*, *Kerria*, *Laburnum*, *Lathyrus*, *Leon-
todon*, *Lilium*, *Linum*, *Lotus*, *Lysimachia*, *Maratia*, *Medicago*, *Mimulus*, *Narcissus*, *Oenothera*, *Osmanthus*, *Petunia*, *Photinia*, *Physalis*, *Phyteuma*, *Potentilla*, *Pyracantha*, *Ranunculus*, *Rhododendron*, *Rosa*, *Rudbeckia*, *Senecio*, *Silene*, *Silphium*, *Sinapsis*, *Solanum tuberosum*, *Sorbus*, *Spartium*, *Tecoma*, *Torenia*, *Tragopogon*, *Trollius*, *Tropaeolum*, *Tulipa*, *Tussilago*, *Ulex*, *Viola* oder *Zinnia* verwendet.
27. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass man als genetisch veränderte Pflanze, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität in Früchten aufweist, eine Pflanze ausgewählt aus den Pflanzengattungen *Actinophloeus*, *Aglaeonema*, *Ananas*, *Arbutus*, *Archontophoenix*, *Area*, *Aronia*, *Asparagus*, *Avocado*, *Attalea*, *Berberis*, *Bixia*, *Brachychilum*, *Bryonia*, *Caliptocalix*, *Capsicum*, *Carica*, *Celastrus*, *Citrullus*, *Citrus*, *Convallaria*, *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Cuscuta*, *Cycas*, *Cyphomandra*, *Dioscorea*, *Diospyrus*, *Dura*, *Elaeagnus*, *Elaeis*, *Erythroxylon*, *Euonymus*, *Erbse*, *Ficus*, *Fortunella*, *Fragaria*, *Gardinia*, *Gonocaryum*, *Gossypium*, *Guava*, *Guilielma*, *Hibiscus*, *Hippophaea*, *Iris*, *Kiwi*, *Lathyrus*, *Lonicera*, *Luffa*, *Lycium*, *Mais*, *Malpighia*, *Mangifera*, *Mormodica*, *Murraya*, *Musa*, *Nenga*, *Orange*, *Palisota*, *Pandanus*, *Passiflora*, *Persea*, *Physalis*, *Prunus*, *Ptychandra*, *Punica*, *Pyracantha*, *Pyrus*, *Ribes*, *Rosa*, *Rubus*, *Sabal*, *Sambucus*, *Seaforita*, *Shepherdia*, *Solanum*, *Sorbus*, *Synaspadix*, *Tabernae*, *Tamus*, *Taxus*, *Trichosanthes*, *Triphasia*, *Vaccinium*, *Viburnum*, *Vignia*, *Vitis* oder *Zucchini* verwendet.
28. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass man als genetisch veränderte Pflanze, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität in Knollen aufweist, *Solanum tuberosum* verwendet.

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 28, dadurch gekennzeichnet, dass die β -Carotinoide ausgewählt sind aus der Gruppe β -Carotin, β -Cryptoxanthin, Zeaxanthin, Antheraxanthin, Violaxanthin und Neoxanthin.

- 5 30. Genetisch veränderte Pflanze, wobei die genetische Veränderung die Aktivität einer β -Cyclase in Pflanzenteilen, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, gegenüber dem Wildtyp erhöht und die erhöhte β -Cyclase-Aktivität durch eine β -Cyclase verursacht wird, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.
- 10
31. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, dass die Erhöhung der β -Cyclase-Aktivität durch eine Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, gegenüber dem Wildtyp bewirkt wird.
- 15
32. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Genexpression Nukleinsäuren in die Pflanze einbringt, die β -Cyclasen kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.
- 20
- 25
33. Genetisch veränderte Pflanze, enthaltend mindestens eine Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, mit der Maßgabe, dass Tomate ausgenommen ist.
- 30

34. Genetisch veränderte Pflanze nach einem der Ansprüche 30 bis 33, dadurch gekennzeichnet, dass die genetische Veränderung zusätzlich die Hydroxylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp erhöht.
- 5 35. Genetisch veränderte Pflanze nach einem der Ansprüche 30 bis 34, dadurch gekennzeichnet, dass die genetische Veränderung zusätzlich mindestens eine der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe ϵ -Cyclase-Aktivität und endogene β -Hydroxylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp reduziert.
- 10 36. Genetisch veränderte Pflanze nach einem der Ansprüche 30 bis 35, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanzengewebe, enthaltend photosynthetisch inaktive Plastide, ausgewählt sind aus der Gruppe Blüte, Frucht und Knolle.
- 15 37. Genetisch veränderte Pflanze nach einem der Ansprüche 30 bis 36, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderte Pflanze, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität in Blüten aufweist, ausgewählt ist aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassiceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, 20 Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Iliaceae oder Lamiaceae.
- 25 38. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 37, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanze ausgewählt ist aus den Pflanzengattungen Marigold, Tagetes erecta, Tagetes patula, Acacia, Aconitum, Adonis, Arnica, Aquilegia, Aster, Astragalus, Bignonia, Calendula, Calendula officinalis, Caltha, Campanula, Canna, Centaurea, Cheiranthus, Chrysanthemum, Citrus, Crepis, Crocus, Curcubita, Cytisus, Delon- 30 nia, Delphinium, Dianthus, Dimorphotheca, Doronicum, Eschscholtzia, Forsythia, Fremontia, Gazania, Gelsemium, Genista, Gentiana, Geranium, Gerbera, Geum, Grevillea, Helenium, Helianthus, Hepatica, Heracleum, Hisbiscus, Heliopsis, Hypericum, Hypochoeris, Impatiens, Iris, Jacaranda, Kerria, Laburnum, Lathyrus, Leontodon, Lilium, Linum, Lotus, Lysimachia, Maratia, Medicago, Mimulus, Narcissus, Oenothera, Osmanthus, Petunia, Photinia, Physalis, Phyteuma, Potentilla, Pyracantha, Ranunculus, Rhododendron, Rosa, Rudbeckia, Senecio, Silene, Silphium, 35 Sinapsis, Solanum tuberosum, Sorbus, Spartium, Tecoma, Torenia, Tragopogon,

Trollius, Tropaeolum, Tulipa, Tussilago, Ulex, Viola oder Zinnia.

39. Genetisch veränderte Pflanze nach einem der Ansprüche 30 bis 36, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderte Pflanze, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität in Früchten aufweist, ausgewählt ist aus den Pflanzengattungen Actinophloeus, Aglaeonema, Ananas, Arbutus, Archontophoenix, Area, Aronia, Asparagus, Avocado, Attalea, Berberis, Bixia, Brachychilum, Bryonia, Caliptocalix, Capsicum, Carica, Celastrus, Citrullus, Citrus, Convallaria, Cotoneaster, Crataegus, Cucumis, Cucurbita, Cuscuta, Cycas, Cyphomandra, Dioscorea, Diospyrus, Dura, Elaeagnus, Elaeis, Erythroxylon, Euonymus, Erbse, Ficus, Fortunella, Fragaria, Gardinia, Gonocaryum, Gossypium, Guava, Guilielma, Hibiscus, Hippophaea, Iris, Kiwi, Lathyrus, Lonicera, Luffa, Lycium, Mais, Malpighia, Mangifera, Mormodica, Murraya, Musa, Nenga, Orange, Palisota, Pandanus, Passiflora, Persea, Physalis, Prunus, Ptychandra, Punica, Pyracantha, Pyrus, Ribes, Rosa, Rubus, Sabal, Sambucus, Seaforita, Shepherdia, Solanum, Sorbus, Synspadix, Tabernae, Tamus, Taxus, Trichosanthes, Triphasia, Vaccinium, Viburnum, Vignia, Vitis oder Zucchini.
40. Genetisch veränderte Pflanze nach einem der Ansprüche 30 bis 36, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderte Pflanze, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität in Knollen aufweist Solanum tuberosum ist.
41. Verwendung der genetisch veränderten Pflanzen oder Pflanzengewebe nach einem der Ansprüche 30 bis 40 als Futter- oder Nahrungsmittel.
42. Verwendung der genetisch veränderten Pflanzen oder Pflanzengewebe nach einem der Ansprüche 30 bis 40 zur Herstellung von β -carotinoidhaltigen Extrakten oder zur Herstellung von β -carotinoidhaltigen Futter- und Nahrungsergänzungsmitteln.
43. Verwendung von zeaxanthinhaltigen Extrakten gemäß Anspruch 42 zur Pigmentierung von Tierprodukten.

Verfahren zur Herstellung von β -Carotinoiden

Zusammenfassung

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von β -Carotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Pflanzen, die genetisch veränderten Pflanzen, sowie deren Verwendung als Nahrungs- und Futtermittel und zur Herstellung von β -Carotinoidextrakten.

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP04/008624

International filing date: 31 July 2004 (31.07.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: EP
Number: PCT/EP/03/09101
Filing date: 18 August 2003 (18.08.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 24 January 2005 (24.01.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☒ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.